



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ MEZIFÁZOVÉ REOLOGIE KE STUDIU
BIOLOGICKÝCH SYSTÉMŮ**

UTILIZATION OF INTERFACIAL RHEOLOGY TO STUDY OF BIOLOGICAL SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Helena Kachlířová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1143/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Helena Kachlířová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Využití mezifázové reologie ke studiu biologických systémů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Zpracovat literární rešerši na téma mezifázové reologie
- 2) Zhodnotit využitelnost této metody pro studium biologických systémů
- 3) Optimalizovat metodu mezifázové reologie
- 4) Prakticky ověřit aplikovatelnost optimalizované metody na reálných modelových vzorcích

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Helena Kachlířová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

V Brně dne 31.1.2017

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na zavedení relativně nové metody mezifázové reologie a na její optimalizaci. Optimalizace metody byla realizována na dvou typech mezifázových rozhraní, a to kapalina-kapalina za použití vzájemně nemísitelných systémů voda-chloroform a voda-toluen a na rozhraní kapalina-vzduch. Aplikovatelnost metody byla testována na reálných vzorcích v podobě povrchově aktivní látky septonex a následně na biologickém systému, konkrétně hovězím sérovém albuminu. Mezifázová rozhraní tvořená molekulami septonexu vykazovala čistě viskózní charakter, přičemž rigidita rozhraní se mírně zvyšovala až do kritické micelární koncentrace a po překročení této koncentrace se snižovala. Naproti tomu hovězí sérový albumin vytvořil na rozhraní film viskoelastického charakteru s převahou elastické složky.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is to implement and optimization a relatively new method of interfacial rheology. The optimization of this method was realized on two types of interfaces, specifically liquid-liquid using immiscible systems water-chloroform and water-toluene, and water-air. The applicability of this method was tested by using real samples in form of surfactant septonex and biological system represented by protein (bovine serum albumin). The interfacial layers formed by septonex were purely viscous, where the rigidity of the layer increased slightly with concentration until reaching critical micellar concentration and then the rigidity decreased. In comparison with septonex, the interfacial film made of bovine serum albumin showed predominantly elastic behaviour.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mezifázová reologie, viskoelastická, povrchově aktivní látky, hovězí sérový albumin

KEY WORDS

Interfacial rheology, viscoelasticity, surface active agents, bovine serum albumin

KACHLÍŘOVÁ, H. *Využití mezifázové reologie ke studiu biologických systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Smílek, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkanem FCH VUT.

Helena Kachlířová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi, PhD. za trpělivost, ochotu, rady a pomoc při vypracování bakalářské práce a za pomoc při řešení experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Šárce Krňávkové za pomoc a rady týkající se experimentální části práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Reologie.....	8
2.1.1	Newtonské kapaliny.....	8
2.1.2	Nenewtonské kapaliny	9
2.1.3	Viskoelasticita.....	10
2.1.4	Oscilační testy	12
2.2	Mezifázová reologie	13
2.2.1	Mezifázová dilatační reologie	13
2.2.2	Mezifázová smyková reologie	14
2.3	Metody stanovení reologických vlastností mezifázových rozhraní	14
2.3.1	Mezifázová dilatační reologie.....	14
2.3.2	Mezifázová smyková reologie – nepřímé metody	16
2.3.3	Mezifázová smyková reologie – přímé metody.....	17
2.4	Mezifázové napětí.....	19
2.5	Povrchově aktivní látky a tvorba micel	20
2.5.1	Tenzidy	20
2.5.2	Tvorba micel	21
2.5.3	Septonex.....	22
2.5.4	Hovězí sérový albumin (BSA).....	23
2.6	Koloidní disperze.....	24
2.6.1	Emulze, pěny a jejich stabilizace	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
4.1	Použité chemikálie.....	37
4.2	Použité přístroje.....	37
4.3	Péče o senzory	37
4.4	Rozhraní kapalina-kapalina	37
4.4.1	Amplitudové a frekvenční testy – postup měření	37
4.5	Rozhraní kapalina-vzduch	38
4.5.1	Příprava vzorků.....	38
4.5.2	Squeeze test – nastavení.....	38
4.5.3	Amplitudové a frekvenční testy – postup měření	38
4.6	Hovězí sérový albumin (BSA)	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	Výběr geometrie	40
5.2	Mezifázové rozhraní – stanovení měřicí polohy	40
5.2.1	Platinový kroužek	40
5.2.2	Bikonický senzor	40
5.3	Optimalizace parametrů.....	42
5.3.1	Objem kapalin.....	42
5.3.2	Dávkování kapalin	43
5.3.3	Porovnání rozhraní voda-toluen a chloroform-voda – amplitudové testy ..	43

5.3.4	Porovnání rozhraní voda-toluen a chloroform-voda – frekvenční testy	44
5.4	Povrchově aktivní látky (septonex)	46
5.4.1	Amplitudové testy	46
5.4.2	Frekvenční testy	49
5.5	Hovězí sérový albumin	52
5.5.1	Amplitudové testy	52
5.5.2	Frekvenční testy	53
6	ZÁVĚR	54
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

1 ÚVOD

Mezifázová reologie je podobor klasické reologie, zaměřený na testování mechanických vlastností mezifázových rozhraní kapalina-kapalina nebo kapalina-plyn. Tato metoda nachází uplatnění zejména při charakterizaci pěn a emulzí, které jsou využívány především ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Mezifázová reologie umožňuje testování emulgátorů na fázových rozhraních z hlediska mechanické, tepelné a časové stability. Využití nachází i v medicíně, kde slouží k testování mechanické, tepelné a časové stability vybraných polyelektrolytů, které mohou být využity jako biokompatibilní a biodegradabilní nosiče léčiv. Své uplatnění nachází i mimo již zmíněné obory, velký význam má například v testování mechanických vlastností tenkých vrstev natěračských barev a laků.

Teoretická část práce se zabývá stručným seznámením s klasickou reologií, podrobnějším popisem mezifázové reologie včetně jejího rozdělení a představení vybraných metod měření.

V rešeršní části současný stav řešené problematiky je řešeno možné využití mezifázové reologie jakožto metody pro studium mechanických vlastností emulgátorů a nosičů léčiv, dějů odehrávajících se na buněčných membránách nebo tvorby filmů na mezifázovém rozhraní, jako je tvorba biofilmů nebo klatrátů.

Experimentální část je primárně zaměřena na podrobnou optimalizaci metody na rozhraní kapalina-kapalina a kapalina-vzduch za použití dvou různých senzorů, a to platinového kroužku (*Du Noüy Ring*) a bikonického senzoru.

Vzhledem k tomu, že se na půdě FCH VUT jedná o poměrně novou metodu stanovení mechanických vlastností mezifázových rozhraní, je nutná komplexní optimalizace především s ohledem na volbu vhodných parametrů měření na modelových systémech jako jsou povrchově aktivní látky (tenzidy). Technika optimalizovaná na modelových systémech tvořených tenzidy byla následně testována i na reálném vzorku, konkrétně pak na proteinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Reologie

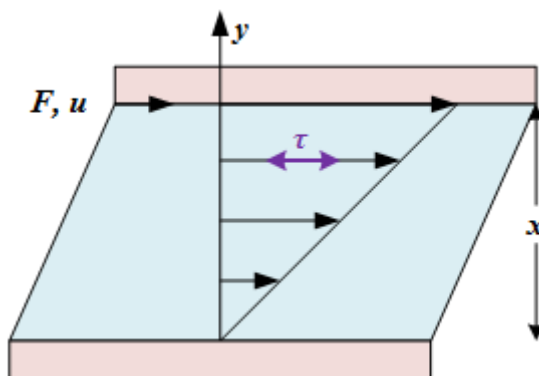
Reologie je multidisciplinární obor na pomezí mechaniky, fyzikální chemie, matematiky a stavebnictví, zabývající se studiem deformace a toku materiálů. Podle mechanických vlastností materiálů rozlišujeme tři základní skupenství, přičemž nejjednodušší modely skupenství představují nevazký ideální plyn, nestlačitelná viskózní newtonská kapalina a izotropní pružné hookovské těleso. Limitními případy jsou ideální kapalina s nulovou viskozitou a ideální tuhé těleso s nekonečně velkým modulem pružnosti, tyto limitní případy jsou však pouze ideálními případy a žádný z reálných materiálů se nechová ideálně. Všechny reálné materiály jsou kombinací předešlých případů, to znamená, že v sobě zahrnují jak elastickou, tak viskózní složku. To, zda u materiálu převládá elastická nebo viskózní složka, je dáno jeho charakterem. Tok většiny materiálů je způsoben zvyšující se deformací. [1]

2.1.1 Newtonské kapaliny

Ideální kapaliny byly popsány Newtonovým zákonem:

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} = \eta \dot{\gamma}, \quad (1)$$

kde τ je tečné napětí, η je dynamická viskozita, du/dx je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin ve vzdálenosti dx a $\dot{\gamma}$ je rychlost smykové deformace. Na Obr. 1 jsou zobrazeny dvě planární desky, každá o ploše A vzdálené od sebe x . Horní deska se pohybuje relativní rychlostí u , poměr u/x je pak vzájemná rychlost pohybu smykových desek.



Obr. 1: Planparalelní desky [2]

Dynamická viskozita newtonských kapalin je látková konstanta, která je závislá na teplotě a tlaku, její hodnota se ale nemění v závislosti na čase, rychlosti smykové deformace a tečném napětí. (Obr. 2 a Obr. 3.)

Pro experimentální stanovení dynamické viskozity slouží tzv. *viskozimetry*, které se dělí na průtokové, tělískové a rotační. Měření viskozity může být buď *absolutní* nebo *relativní*.

Při *absolutním* měření se viskozita určuje změřením veličin obsažených v Poiseuillově rovnici, vyjádření viskozity z Poiseuillovy rovnice se mění v závislosti na druhu viskozimetru. Pro průtokový viskozimetr je vyjádření viskozity následující:

$$\eta = \frac{\pi r h \rho g}{8 V l}, \quad (2)$$

kde, r je poloměr trubice, l délka trubice, h výška trubice, ρ hustota kapaliny, g tíhové zrychlení, t doba toku a V je objem vyteklé kapaliny.

Při *relativním měření* se dynamická viskozita určuje pomocí jiné kapaliny o známé hodnotě dynamické viskozity. [3], [4]

2.1.2 Neneutonské kapaliny

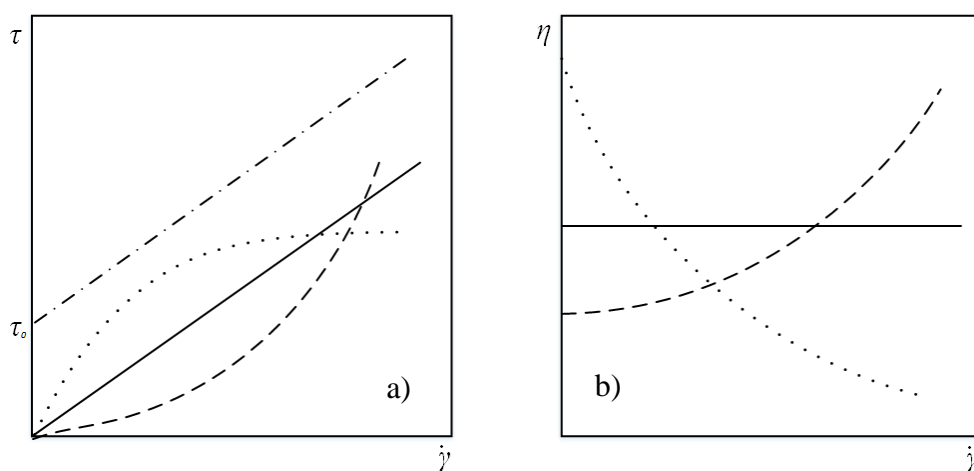
Kapaliny, jejichž chování se neřídí Newtonovým zákonem, se označují jako kapaliny neneutonské. I pro neneutonské kapaliny platí Newtonův zákon:

$$\tau = \eta_{zd} \dot{\gamma}, \quad (3)$$

kde namísto dynamické viskozity, jak tomu bylo u newtonských kapalin, představuje η_{zd} zdánlivou viskozitu, která není látkovou konstantou, ale mění se v závislosti na čase, rychlosti smykové deformace i tečném napětí. (Obr. 2 a Obr. 3)

Podle typu závislosti zdánlivé viskozity na rychlosti smykové deformace se neneutonské kapaliny dělí na:

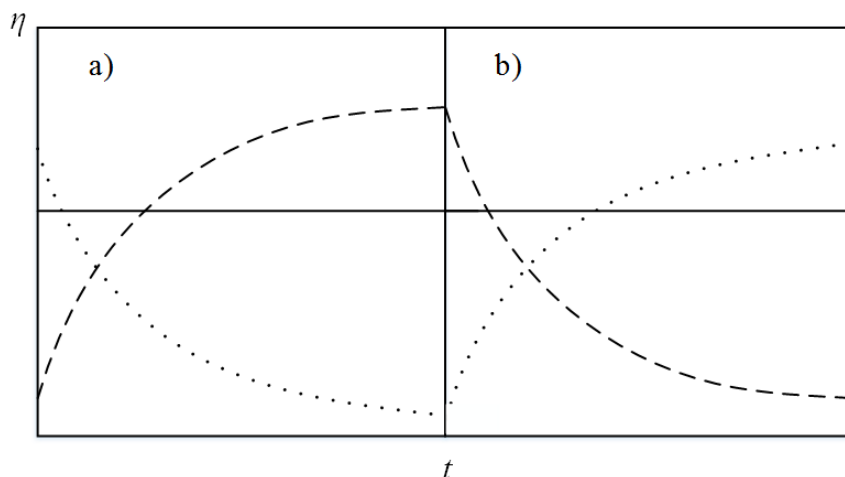
- Pseudoplastické kapaliny*, jejichž zdánlivá viskozita klesá s rostoucí $\dot{\gamma}$. Pseudoplastické kapaliny se dále dělí na pravé pseudoplastické kapaliny (jejich viskozita je závislá na $\dot{\gamma}$ v celém rozsahu) a strukturně viskózní kapaliny (mají dvě limitní hodnoty zdánlivé viskozity). Této vlastnosti kapalin se využívá například při jejich přepravě, kdy se vysoce viskózní látka míchá, aby se snížila její viskozita a následná přeprava potrubím byla méně energeticky náročná.
- Dilatantní kapaliny*, jejichž zdánlivá viskozita roste v závislosti na $\dot{\gamma}$. Toto chování je většinou nežádané, protože komplikuje technologické procesy.
- Binghamské kapaliny*, u nichž dochází k toku až při dosažení určité rychlosti smykové deformace, tyto kapaliny vykazují určitou mez toku τ_0 .



Obr. 2: a) závislost tečného napětí na rychlosti smykové deformace, b) závislost viskozity na smykové rychlosti deformace pro newtonskou kapalinu (plná čára), pseudoplastickou kapalinu (tečkovaná), dilatantní kapalinu (čárkovaná) a binghamskou kapalinu (přerušovaná) [4]

Kromě prvního způsobu dělení je možné nenewtonské kapaliny dělit i v závislosti zdánlivé viskozity na čas působení napětí. Existují dva základní typy:

- Tixotropní látky*, u nichž zdánlivá viskozita klesá s prodlužující se dobou, po kterou jsou vystavovány napětí. Po odeznění působícího napětí se viskozita tixotropního systému limitně blíží k původní hodnotě viskozity viz Obr. 3.
- Reopektické látky* jsou látky, u nichž dochází ke zvyšování zdánlivé viskozity s dobou působení napětí. Po odstranění působícího napětí viskozita opět klesá k původní hodnotě.



Obr. 3: Časová závislost zdánlivé viskozity pro newtonskou kapalinu (plná čára), tixotropní kapalinu (tečkovaná) a reopektickou kapalinu (čárkovaná) a) při působení napětí na kapalinu, b) při odstranění zdroje napětí [4]

Experimentální stanovení funkční závislosti zdánlivé viskozity na tečném napětí, rychlosti smykové deformace nebo čase je úkolem reometrie a viskozimetrie. [3], [4]

2.1.3 Viskoelastická

Jak už bylo zmíněno, každý reálný materiál obsahuje viskózní i elastickou složku, proto takové materiály nazýváme viskoelastické. Viskoelastický charakter materiálů je vyjadřován pomocí následujících veličin:

Komplexní smykový modul G^* se skládá z reálné složky, tj. z elastického modulu G' (paměťový modul) a imaginární složky, tj. z viskózního modulu G'' (ztrátový modul), ω je úhlová frekvence:

$$G^*(i\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega). \quad (4)$$

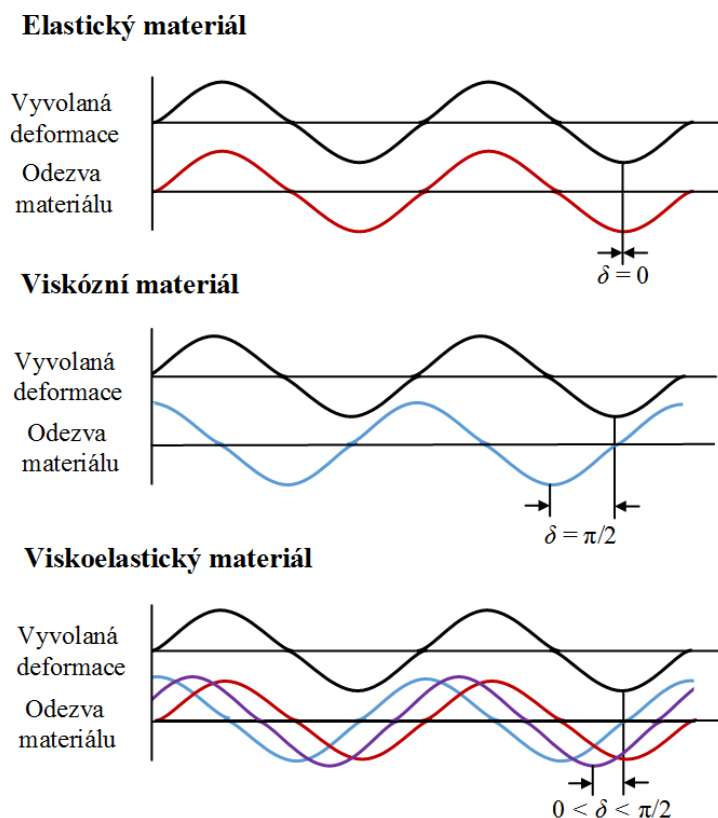
Elastický modul G' je mírou deformační energie uložené vzorkem během smykového procesu. Po ukončení působení deformace na vzorek je tato energie využita pro úplné nebo částečné vrácení materiálu do původního stavu. Materiál, který je schopný ukládat všechnu deformační energii a bude po ukončení testu v nezměněném stavu, nazýváme ideálně elastickým (Hookovo těleso).

Viskózní modul G'' představuje množství deformační energie, které je spotřebováno vzorkem během smykového procesu. Tato energie je spotřebována při změně struktury vzorku a proto je pro vzorek disipována. Změna struktury vzorku v takovém případě způsobuje jeho tok. Materiál, který spotřebovává všechnu deformační energii během smykového procesu je nazýván ideálně viskózním materiálem (Newtonská kapalina).

Ztrátový úhel $\tan \delta$:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} , \quad (5)$$

Tangens ztrátového úhlu opět vystihuje jak elastickou, tak viskózní složku materiálu a je roven podílu viskózního a elastického modulu. Pokud je na vzorek působeno určitou deformací, odezva materiálu na tento signál závisí na charakteru materiálu. Na Obr. 4 jsou uvedeny příklady odezvy elastického, viskózního a viskoelastického materiálu. Odezva elastického materiálu je ve fázi s vyvíjenou deformací na tento materiál, kdežto odezva viskózního materiálu je v protifázi s vyvíjenou deformací. Odezva viskoelastického materiálu je potom mezi oběma předešlými případy a je charakterizována fázovým posunem δ . Z Obr. 4 plyne, že pro ideálně elastický materiál je $\delta = 0^\circ$ a tangens ztrátového úhlu se rovná nule a pro ideálně viskózní materiál je $\delta = 90^\circ$ a tangens ztrátového úhlu se blíží nekonečnu. Pokud je fázový posun δ u materiálu menší než $\pi/4$ (45°), bude převažovat elastická složka, pokud je fázový posun větší než $\pi/4$, bude u materiálu převažovat složka viskózní. [5], [6]



Obr. 4: Schématické znázornění odezvy elastického, viskózního a viskoelastického materiálu na působenou deformaci [6]

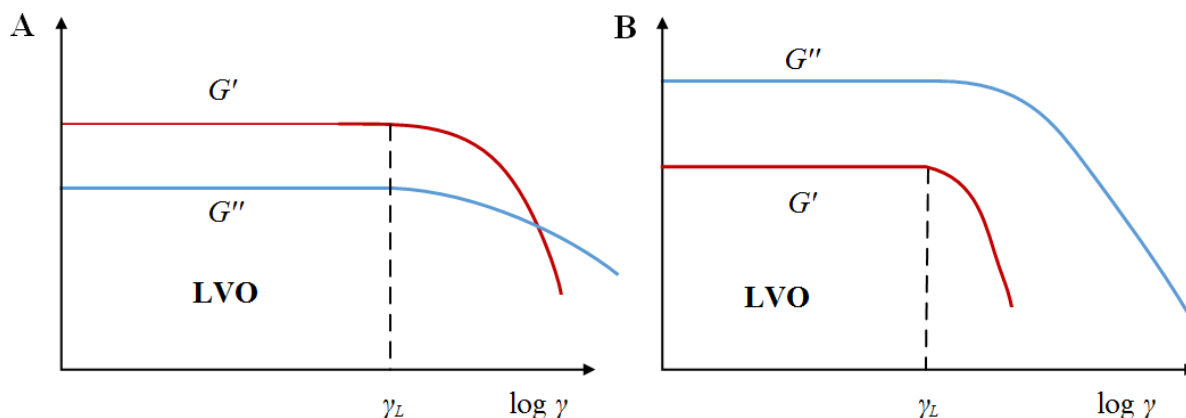
2.1.4 Oscilační testy

Ke sledování viskoelastických vlastností materiálů, v případě této práce mezifázových rozhraní, mohou být využity oscilační testy, které jsou využívány v této práci. Tyto testy zahrnují test amplitudový a frekvenční. Jak bude podrobněji popsáno v 2.3.3, k měření jsou používány senzory různých geometrií, které se umisťují přímo na mezifázové rozhraní a jejich oscilací dochází k namáhání mezifázové vrstvy.

Amplitudový test

Amplitudový test (*strain sweep*) je závislostí viskoelastických veličin (2.1.3), nejčastěji G' a G'' , na zvyšující se amplitudě deformace γ při konstantní frekvenci oscilace senzoru. Při nízkých hodnotách deformace jsou oba moduly konstantní (tj. nezávislé na aplikované deformaci), tato oblast se nazývá lineární viskoelastická oblast (LVO). V této oblasti mohou nastat tři situace:

- $G' > G''$: v tomto případě převažuje elastická složka, což je typické pro pevné, polotuhé a gelovité materiály. (Obr. 5A)
- $G' < G''$: v tomto případě převažuje viskózní složka. Toto chování je typické pro kapaliny, jejichž molekuly netvoří chemickou ani fyzikální síť. (Obr. 5B)
- $G' = G''$: pokud mají oba moduly stejnou hodnotu, bývá toto chování označováno jako „at the gel point“. Materiál se nachází přesně na pomezí liquid-like a solid-like chování.



Obr. 5: Závislost elastického modulu G' a viskózního modulu G'' na amplitudě deformace [5]

Hodnota amplitudy deformace, při které končí LVO, se nazývá limitní amplituda deformace γ_L . V nižších hodnotách, než je γ_L , dochází k elastické deformaci, což znamená, že materiál je schopný kompenzovat vyvolanou deformaci uložením deformační energie a vrátit se do původního stavu, ve vyšších hodnotách amplitudy deformace dochází k nevratné změně struktury materiálu, tzv. neelastické deformaci, při které deformační energie není ukládána a využita na navrácení původního stavu materiálu, ale je disipována. Při těchto deformacích tedy dochází k nevratnému porušení struktury vzorku. [5]

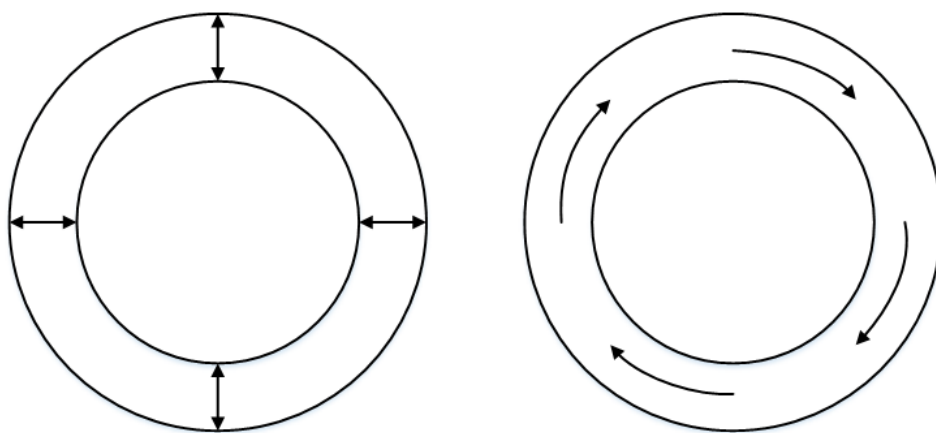
Frekvenční test

Tento test je závislostí viskoelastických veličin na frekvenci oscilací senzoru při konstantní amplitudě deformace striktně vybrané z lineární viskoelastické oblasti. Pro tento test je

nezbytné nejprve provést amplitudový test a určit limitní amplitudu deformace γ_L , která je při frekvenčním testu nastavena jako konstantní hodnota. Výsledná závislost vypovídá o chování materiálu při různém namáhání. [5]

2.2 Mezifázová reologie

Mezifázová reologie, někdy označovaná jako dvojrozměrná reologie, se zabývá měřením mezifázové viskozity a viskoelastických vlastností, jako je komplexní smykový modul, viskózní a elastický modul, ztrátový úhel nebo komplexní viskozita. Pomocí mezifázové reologie je stanovována síla potřebná ke změně tvaru vrstvy vytvořené na mezifázovém rozhraní. V mezifázové reologii rozlišujeme dvě základní deformace mezifázové vrstvy, a to expanzi/kompresi a deformaci smykem. Na základě aplikované deformace se mezifázová reologie dělí do dvou kategorií. [7], [8]



Obr. 6: Znáznornění deformace pomocí expanze/kompresi (vlevo) a smykové deformace (vpravo) [7]

2.2.1 Mezifázová dilatační reologie

Mezifázová dilatační reologie popisuje odezvu mezifázové vrstvy na expanzi nebo kompresi, viz Obr. 6 (vlevo). Při těchto deformacích dochází ke změně plochy, přičemž tvar vrstvy zůstává zachován. Deformace mohou být harmonické nebo přechodné. Výstupem této metody může být dilatační elasticita, která udává množství energie uložené v mezifázové vrstvě jako změnu mezifázového napětí způsobenou změnou plochy vrstvy. Z toho důvodu mohou být reologické mezifázové dilatační metody označovány jako tenziometrické. Často bývá používána i mezifázová dilatační viskoelasticita, která je představována jako komplexní modul ε :

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d \ln A} = A \frac{d\gamma}{dA}, \quad (6)$$

kde A je plocha mezifázové vrstvy a dA je element plochy nekonečně malých rozměrů. Komplexní modul sestává z reálné části, tj. elastického modulu ε_d a imaginární části, tj. viskózního modulu ε_η :

$$\varepsilon = \varepsilon_d + i\omega\eta_d\varepsilon_\eta. \quad (7)$$

Vyjádření dilatační elasticity se mění v závislosti na povrchově aktivních látkách tvořících mezifázový film. Nejjednodušším případem je film tvořený pouze jednou povrchově aktivní látkou pod kritickou micelární koncentrací, složitějším případem je film tvořený směsí povrchově aktivních látek, nebo případ, kdy je koncentrace povrchově aktivní látky nad kritickou micelární koncentrací a dochází tedy ke tvorbě micel. V přítomnosti micel v roztoku závisí dilatační elasticita na jejich množství, poměru difúzních koeficientů monomerů a micel, na agregačním čísle (počet molekul tvořící micelu) a rozdílu celkové koncentrace povrchově aktivní látky a kritické micelární koncentrace v podílu s kritickou micelární koncentrací. [7]

2.2.2 Mezifázová smyková reologie

U mezifázové smykové reologie dochází na základě deformace ke změně tvaru mezifázové vrstvy, přičemž plocha zůstává zachována. Mezifázová smyková reologie poskytuje informace o tvorbě sítě (sítové struktury) na mezifázovém rozhraní a interakčních silách mezi jednotlivými molekulami tvořícími mezifázovou vrstvu. Můžeme rozlišit dva základní druhy mezifázové vrstvy:

- a) *Gibbsovy vrstvy*, které vznikají adsorpcí rozpustných povrchově aktivních látek na mezifázovém rozhraní.
- b) *Langmuirovy vrstvy*, které vznikají rozprostřením nerozpustných látek na mezifázovém rozhraní.

Jedním z možných výstupů této metody je mezifázový smykový modul G_i , který je definován jako činitel úměrnosti mezi aplikovanou deformací γ_{xy} a smykovým napětím τ_{xy} :

$$\tau_{xy} = \frac{G_i}{\gamma_{xy}} . \quad (8)$$

Tento vztah platí pro mezifázové vrstvy s charakterem pevné látky, u kterých je pozorováno elastické chování (hookovské chování). Pro mezifázové vrstvy s kapalným charakterem dostáváme čistě viskózní chování (newtonské chování):

$$\tau_{xy} = \frac{\eta_i du_{xy}}{dx} . \quad (9)$$

V tomto případě je smykové napětí úměrné smykové rychlosti a činitelem úměrnosti je mezifázová smyková viskozita.

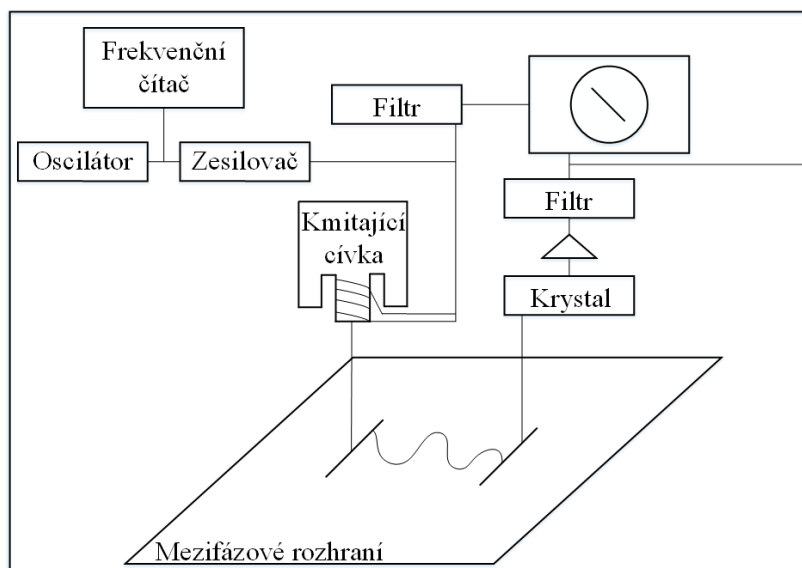
2.3 Metody stanovení reologických vlastností mezifázových rozhraní

2.3.1 Mezifázová dilatační reologie

Tlumení kapilárních vln (damping capillary waves)

Nejstarší metoda mezifázové dilatační reologie je tlumení kapilárních vln. Metoda je použitelná pouze na rozhraní kapalina-plyn. Aparatura může mít několik podob, protože pro tuto metodu nikdy nebylo vyráběno komerční zařízení. Jedno z možných provedení je zobrazeno na Obr. 7. V tomto případě jsou na povrch kapaliny rovnoběžně umístěny dvě tyčinky, jedna je připojena na pohyblivou se cívku a vytváří kapilární vlny s konstantní amplitudou. Druhá tyčinka je

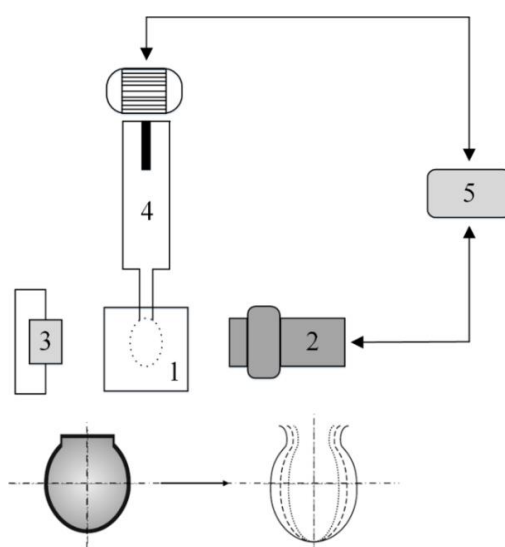
umístěna o několik centimetrů dál a připevněna na krystalový převodník, který zaznamenává amplitudu vln pohybujících druhou tyčinkou. Poměr amplitud a fázový úhel na vstupu a výstupu se přepočítávají na dilatační reologické parametry. [7], [9]



Obr. 7: Aparatura pro metodu tlumení kapilárních vln [9]

Oscilující kapka/bublina (oscillating drop/bubble)

Metod založených na tvorbě kapky nebo bubliny je celá řada. Nejčastěji používanou metodou pro stanovení mezifázových dilatačních reologických parametrů na rozhraní kapalina-kapalina nebo kapalina-plyn je oscilující kapka/bublina. Metoda funguje na principu oscilace kapky nebo bubliny, tzn. na zvětšování a zmenšování jejího objemu. Výstupem metody je závislost povrchového napětí na čase a změně plochy povrchu kapky. Povrch kapky je určován opticky měřením několika parametrů, ze kterých se vypočítá výsledný povrch. Na Obr. 8 je znázorněna aparatura s optickou detekcí. [7], [10]



Obr. 8: Aparatura pro metodu oscilující kapky/bubliny: (1) měřicí cela s polární kapalinou obsahující surfaktanty, (2) videokamera, (3) světelný zdroj, (4) dávkovací jednotka s nepolární kapalinou nebo plynem a (5) počítač. [10]

2.3.2 Mezifázová smyková reologie – nepřímé metody

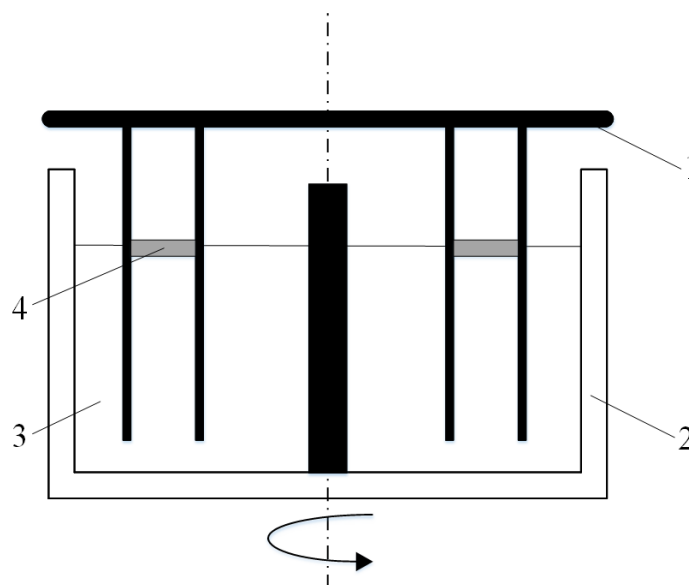
Nepřímé metody jsou založeny na měření mezifázové viskozity na základě změny polohy standardní částice, například částice mastku, která je sledována pomocí optických metod. [7]

Kanálový povrchový viskozimetr

Metoda se používá pro měření viskozity mezifázové vrstvy, a je založena na rychlosti průtoku povrchového filmu velmi úzkým kanálkem nebo štěrbinou. Průtok filmu je zajištěn rozdílem tlaků na obou koncích kanálu. [7], [11]

Povrchový viskozimetr s hlubinným kanálem

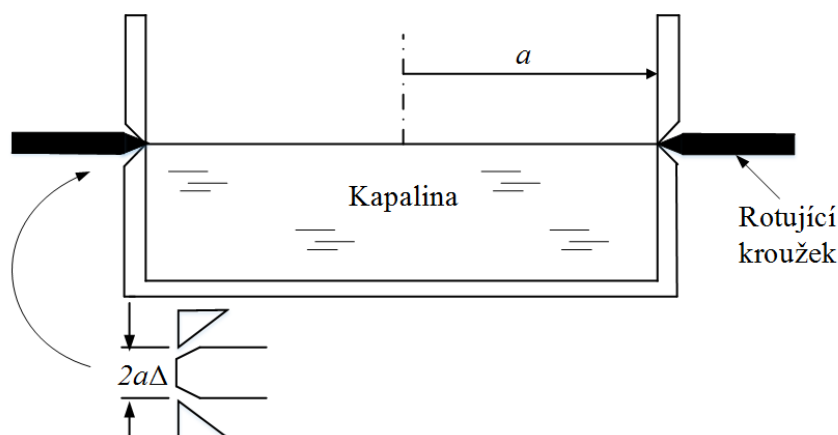
Moderní obměnou předchozí metody je povrchový viskozimetr s hlubinným kanálem, který se skládá ze dvou soustředných, stacionárních svislých válců. Válce jsou umístěny tak, aby se téměř dotýkaly plochého dna nádoby. Nádoba rotuje s konstantní úhlovou rychlostí. Standardní částice je umístěna na mezifázovém rozhraní. Pozoruje se deformace mezifázové vrstvy mezi oběma válci. [7], [11]



Obr. 9: Schéma povrchového viskozimetru s hlubinným kanálem: (1) statická část přístroje, (2) rotující nádoba, (3) kapalina, (4) mezifázová vrstva se standardní částicí [10]

The rotating wall knife-edge surface viscometer

Tato metoda je, stejně jako předchozí metody, založena na pozorování pohybu standardní částice. Měření probíhá ve speciální nádobě, která má ve své štěně po celém obvodu zabudovaný kroužek s ostrou hranou (*knife-edge ring*). Ostrá hrana kroužku směřuje dovnitř měřicí nádoby a musí být přesně v úrovni povrchové vrstvy kapaliny. Otáčením kroužku je vyvolán pohyb povrchové vrstvy a ten je sledován pomocí změny polohy standardní částice nacházející se na povrchu kapaliny (Obr. 10). [12]



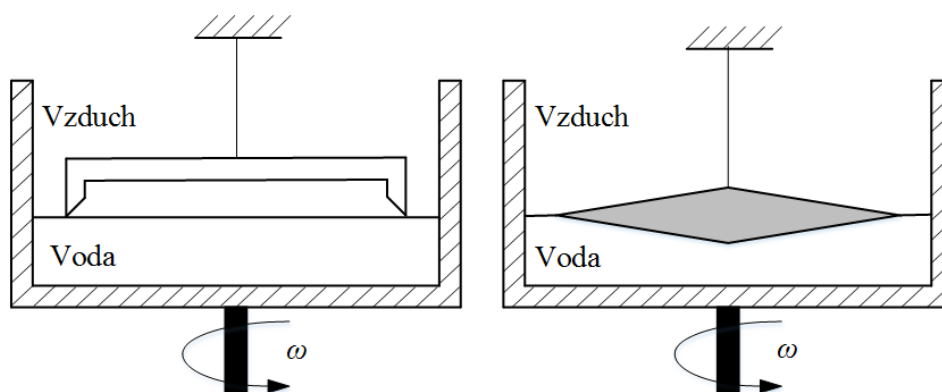
Obr. 10: The rotating wall knife-edge surface viscometer [12]

2.3.3 Mezifázová smyková reologie – přímé metody

Přímé metody jsou, na rozdíl od nepřímých metod, založeny na deformaci mezifázové vrstvy pomocí předmětů, které jsou v přímém kontaktu s mezifází. [7]

Reometr s torzním kyvadlem

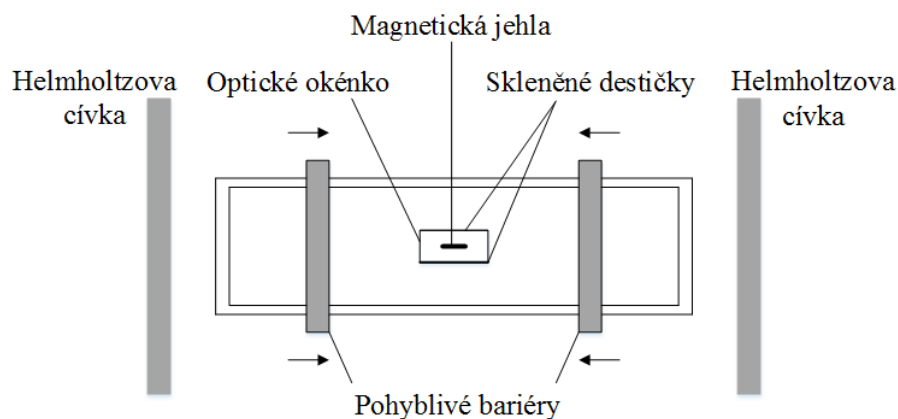
Jednou z nejstarších metod používaných v mezifázové reologii je reometr s torzním kyvadlem. Na Obr. 11 jsou dva typy kyvadla připevněné na torzním drátu. Kyvadlo je umístěno přesně na mezifázové rozhraní. Nádoba s kapalinou/kapalinami rotuje a je zaznamenáván pohyb kyvadla způsobený pohybem mezifázové vrstvy. Bikonické kyvadlo je vhodné pro rozhraní kapalina-kapalina, zatímco kyvadlo s ostrou hranou se hodí pro měření mezifázové viskozity na rozhraní kapalina-plyn. [7]



Obr. 11: Reometr s torzním kyvadlem: (vlevo) sharp knife-edge, (vpravo) bikonická geometrie [12]

Oscilující magnetická jehla

Tento reometr sestává z magnetické jehly plující na mezifázovém rozhraní kapalina-kapalina, která se nachází mezi dvěma skleněnými deskami v rovnoběžné poloze (Obr. 12). Na jehlu je působeno vnějším magnetickým polem, čímž dochází k pohybu jehly. Po vložení střídavého proudu dojde k oscilaci jehly a k deformaci mezifázové vrstvy v jejím okolí. Reologické vlastnosti se vypočítají z dodaného smykového napětí a pozice jehly. Pohyb jehly je pozorován zabudovaným mikroskopem. [7], [11]

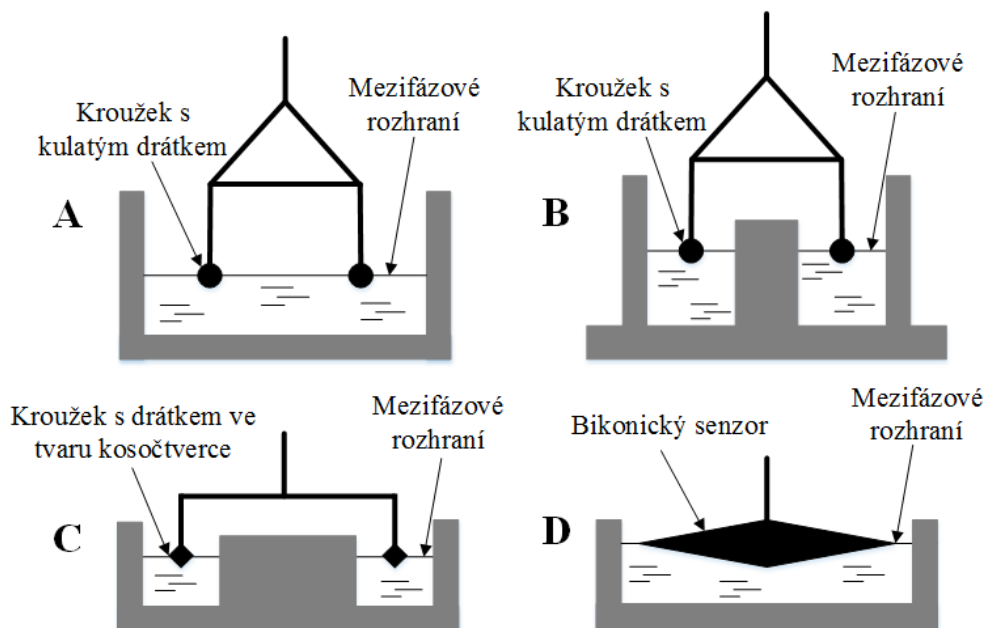


Obr. 12: Aparatura pro metodu oscilující magnetické jehly [7]

Klasický reometr

Reologické vlastnosti mezifázových rozhraní je možné měřit i s klasickým reometrem se speciálními senzory. Mezifázový film je deformován otáčením/oscilacemi senzoru na rozhraní. Na Obr. 13 jsou vyobrazeny čtyři známé geometrie:

- a) *Kroužek (Du Noüy Ring)* – tento kroužek je primárně využíván při měření povrchového napětí. Je vyroben z platiny a iridia zejména kvůli inertním vlastnostem. Průměr kroužku je 20 mm a průměr drátku 0,36 mm. Díky své lehké konstrukci je senzor citlivý, a tím pádem vhodný i k testování křehkých nebo velmi viskózních mezifázových vrstev. Kroužek se na mezifázové rozhraní umísťuje manuálně, nevýhodou ovšem je, že může dojít k chybě ze strany operátora. [13]
- b) *Kroužek s měřicí nádobou s dvojitou stěnou (Double Wall Du Noüy Ring)* – tato geometrie využívá stejný kroužek, který je popsán výše. Rozdíl je v tom, že v tomto případě se využívá nádoba s dvojitou stěnou, což umožňuje měření viskoelastických vlastností i pro velmi malá množství vzorku. [14]
- c) *Kroužek s měřicí nádobou s dvojitou stěnou (Double Wall Ring)* – tato geometrie je podobná předchozí geometrii. Rozdíl je ve tvaru drátku, který kroužek tvoří a v průměru kroužku. Drátek má tvar kosočtverce, což umožňuje lepší uchycení mezifázového filmu na kroužek a dosažení přesnějších výsledků. Průměr kroužku je 60 mm. [14]
- d) *Bikonický senzor* je vyroben z nerezové oceli. Díky ostré hraně umístěné na mezifázovém rozhraní dochází opět k lepšímu uchycení mezifázového filmu než u klasického kroužku (*Du Noüy Ring*). Kvůli své robustnosti je ale citlivost senzoru nižší, než u kroužku a je proto vhodný především pro elastická rozhraní. Výhodou je, že hledání rozhraní není prováděno manuálně a je tak omezeno pochybení ze strany operátora. [14]



Obr. 13: Geometrie senzorů: (A) kroužek (Du Noüy Ring), (B) kroužek (Double Wall Du Noüy Ring) s měřicí nádobou s dvojitou stěnou, (C) kroužek (Double Wall Ring) s měřicí nádobou s dvojitou stěnou, (D) bikonický senzor [14]

2.4 Mezifázové napětí

Kapalina drží pohromadě kombinací sil působících mezi molekulami, které jsou označovány jako síly kohezní. Kohezní síly se experimentálně stanovují pomocí stlačování kapaliny, u viskózních materiálů je možné kohezní síly stanovovat reometricky, kde je pozorováno odtržení materiálu od senzoru. Při vztažení kohezních sil na plošnou jednotku dostaneme kohezní tlak, který je zodpovědný za povrchové a mezifázové napětí. Molekuly nepolárních kapalin jsou drženy pohromadě van der Waalsovými silami na rozdíl od polárních kapalin, jejichž molekuly jsou pohromadě drženy vodíkovými můstky a elektrostatickými silami působícími mezi polárními molekulami. Vzhledem k silnějším interakcím mezi molekulami polárních kapalin, je kohezní tlak polární kapaliny několikanásobně vyšší. Mísitelnost kapalin je potom dána hodnotou jejich kohezního tlaku. Kapaliny s podobnou hodnotou kohezního tlaku jsou mísitelné, zatímco kapaliny s velkým rozdílem kohezních tlaků mísitelné nejsou. [8]

Kromě kohezního tlaku jednotlivých kapalin, závisí mezifázové napětí mimo jiné na teplotě, charakteru použité povrchově aktivní látky a na koncentraci povrchově aktivní látky. Při použití povrchově aktivních látek se na mezifázovém rozhraní tvoří tzv. gradient mezifázového napětí. Tento gradient je zapříčiněn nerovnoměrným rozložením surfaktantů na mezifázovém rozhraní a vyvolává přirozený pohyb mezifázové vrstvy nazývaný Marangoniho efekt.

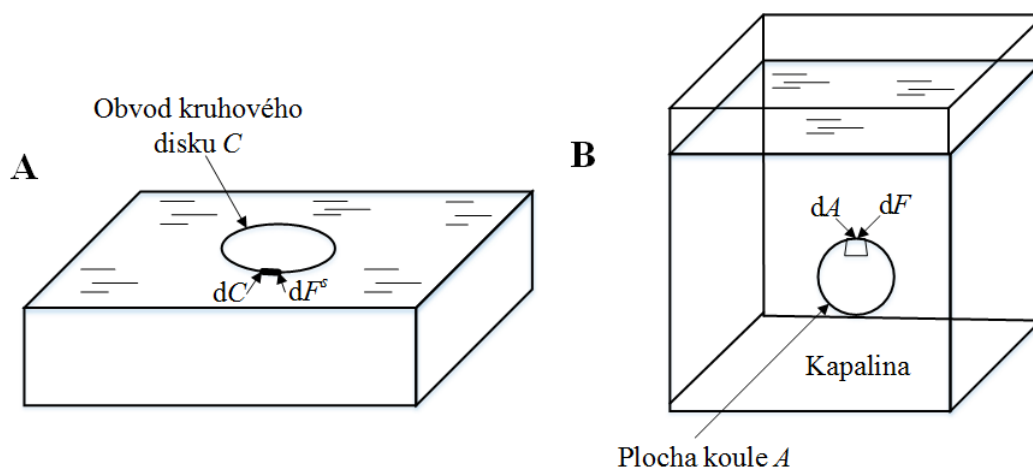
Mezifázové napětí se značí σ a je dáno rovnicí:

$$dF^s = \sigma dC, \quad (10)$$

kde dF^s je tažná síla, kterou působí kapalina na element kruhového disku nekonečně malé tloušťky a obvodu C , v rovnici označený jako dC . Stejně jako na kruhový disk působí tlaková síla tekutiny i na element dA povrchu kapky nebo bubliny do ní ponořené. V tomto případě je tlaková síla dána rovnicí:

$$dF = p dA \quad (11)$$

Ze srovnání obou rovnic vyplývá, že mezifázové napětí je dvojrozměrným ekvivalentem trojrozměrného tlaku tekutiny p . Oba popsání případy jsou znázorněny na Obr. 14. [12]



Obr. 14: (A) Působení mezifázového napětí na kruhový disk o obvodu C , (B) Působení tlaku kapaliny na povrch kapky/bubliny [12]

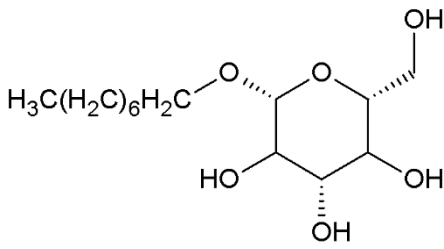
2.5 Povrchově aktivní látky a tvorba micel

2.5.1 Tenzidy

Tenzidy neboli povrchově aktivní látky jsou většinou organické sloučeniny, nejčastěji vyšší mastné kyseliny nebo alkoholy, které jsou schopné se hromadit na mezifázovém rozhraní již při nízkých koncentracích těchto látek v roztoku a tím snižovat povrchové a mezifázové napětí. Typické tenzidy mají ve své struktuře polární hydrofilní část a nepolární hydrofobní část, která je zpravidla tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem. Důležitou vlastností tenzidů je rychlost jejich adsorpce na mezifázové rozhraní, která je dána rychlostí difúze z celkového roztoku. Rychlost difúze je závislá například na koncentraci tenzidu v celkovém objemu, na struktuře a velikosti tenzidu nebo na dynamické viskozitě a teplotě rozpouštědla. Povrchové a mezifázové napětí čistých látek je možné považovat za stavovou veličinu, v přítomnosti tenzidů můžeme povrchové a mezifázové napětí považovat za stavovou veličinu pouze v rovnováze, kdy je počet molekul tvořící rozhraní konstantní. [15], [8], [12]

Tenzidy je možné dělit podle jejich využití na mýdla, detergenty, emulgátory, disperzní činidla nebo smáčedla. Podle náboje, který nese povrchově aktivní část molekuly, dělíme tenzidy do čtyř skupin, a to na *anionické*, *kationické*, *amfoterní* a *neionické* tenzidy. Příklady tenzidů z jednotlivých skupin jsou uvedeny v Tab. 1. [15]

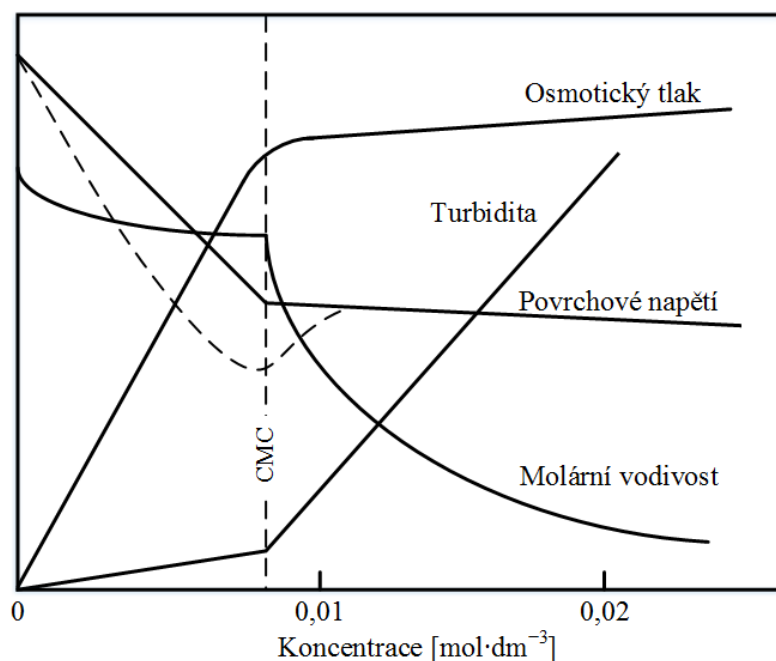
Tab. 1: Příklady tenzidů jednotlivých skupin [15]

Typ tenzidu	Název	Vzorec
Anionický	stearát sodný	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^- \text{Na}^+$
Kationický	dodecylamin hydrochlorid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$
Amfoterní	dodecyl betain	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2\text{COO}^-)$
Neionický	n-oktyl-β-D-glukopyranosid	

2.5.2 Tvorba micel

Ve velmi zředěných roztocích se povrchově aktivní látky chovají jako rozpuštěný podíl rozptýlený v celém objemu, jehož část se adsorbuje na povrch/mezifázové rozhraní. Nad určitou koncentrací začne docházet ke shlukování molekul povrchově aktivní látky – ke tvorbě micel. Tato koncentrace je označována jako *kritická micelární koncentrace* (CMC). Od dosažení CMC je v roztoku vedle micel přítomno konstantní množství volných molekul surfaktantu, které se v maximálním možném počtu nachází na mezifázovém rozhraní (rozhraní je satureováno) a v menší míře jsou přítomny volně v roztoku. Pokud dochází ke zvyšování koncentrace tenzidu, navyšuje se pouze počet micel a množství volného tenzidu již zůstává zachováno. Kritická micelární koncentrace je závislá na mnoha faktorech, jedním z nejdůležitějších faktorů je délka uhlovodíkového řetězce tenzidu. Čím vyšší je počet uhlíků v řetězci, tím nižší je CMC. V případě ionických micel je možné snížit CMC přidáním elektrolytu, který ve vodném prostředí podléhá disociaci a snižuje tak odpuzování stejně nabitých skupin na povrchu micely. Podobně jako pomocí elektrolytu je možné snížit CMC přidáním organické látky.

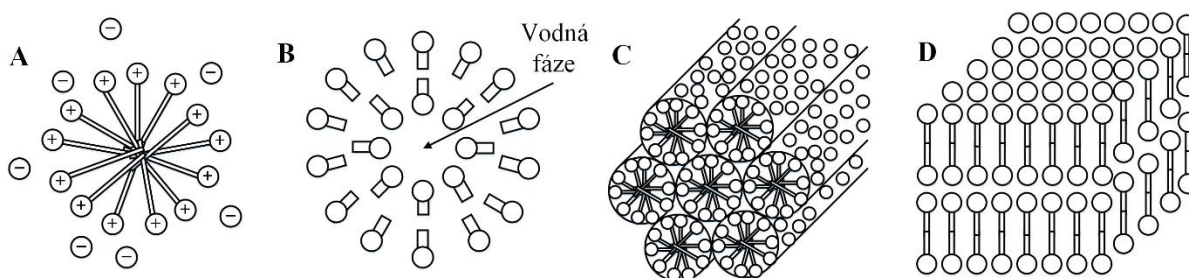
Na koncentraci tenzidu je závislá řada veličin, např. osmotický tlak, turbidita, konduktivita nebo povrchové napětí. Sledováním jedné ze zmíněných veličin v závislosti na koncentraci tenzidu v celkovém roztoku je možné určit kritickou micelární koncentraci. Jak je patrné z Obr. 15, CMC představuje koncentraci tenzidu, při níž dochází k významným změnám měřených fyzikálních vlastností (např. osmotický tlak, turbidita, aj.).



Obr. 15: Fyzikální vlastnosti roztoků dodecylsírany sodného (SDS) při 25 °C [15]

Micely jsou většinou kulovité, lamelární nebo cylindrické útvary, hydrofobní uhlovodíkové řetězce tenzidů jsou orientované dovnitř micely a hydrofilní skupiny tenzidu tvoří povrch micely viz Obr. 16. Nejtypičtější je kulovitý tvar micel, který je pozorován i při vysokých koncentracích nad CMC. Příkladem kulovitého tvaru micel mohou být i živé buňky, jelikož uspořádání fosfolipidové dvojvrstvy může být považováno za micelární strukturu (Obr. 16B). Struktura a velikost micel závisí především na povaze lyofilní části tenzidu.

Micela je charakterizovaná číslem m , které představuje počet monomerů, kterými je micela tvořena a nazývá se *agregační číslo*. Počet monomerů m je velmi závislý na počtu atomů uhlíku v uhlovodíkovém řetězci n . S rostoucím počtem atomů uhlíku n roste počet monomerů m vytvářejících micelu. Micely mohou rozpouštět i ve vodě nerozpustné organické látky, které se inkorporují dovnitř micely. [15]

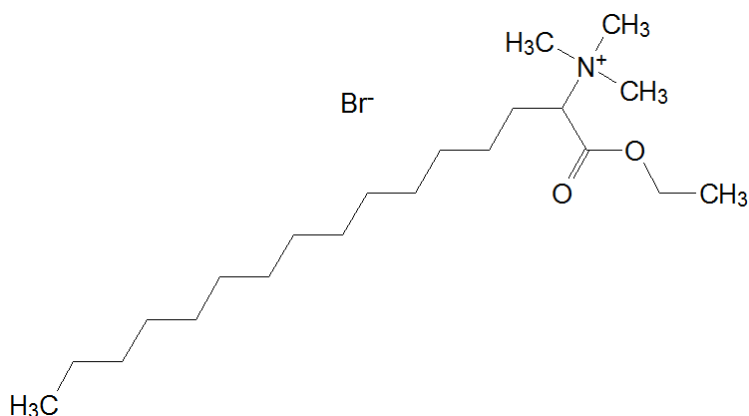


Obr. 16: Micelární struktury: (A) a (B) kulovitý tvar, (C) cylindrický tvar a (D) lamelární tvar [15]

2.5.3 Septonex

Septonex, neboli karbethopendecinium bromid, je kationická povrchově aktivní látka s molekulovým vzorcem $C_{21}H_{44}BrNO_2$. Molární hmotnost septonexu je 422,492 g/mol. Kritická micelární koncentrace se pohybuje mezi $7,9 \cdot 10^{-4}$ a $8,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Protože se jedná

o kvartérní amoniovou sůl, nositelem kladného náboje je dusík viz Obr. 17, a nepolární část je tvořena uhlovodíkovým řetězcem. [16], [17]

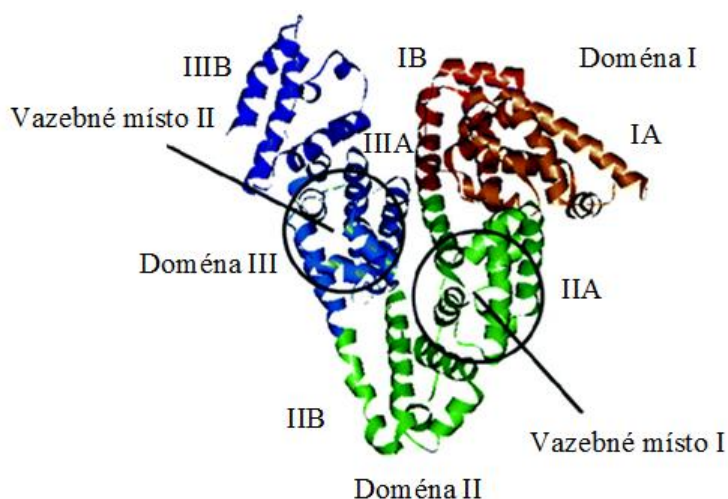


Obr. 17: Strukturní vzorec septonexu [17]

Septonex má dezinfekční a antimikrobiální účinky a nachází se v dezinfekčních prostředcích na kůži v podobě spreje s názvem Septonex, v oční masti nebo kapkách Ophthalmo-septonex používané například na zánět spojivek nebo v nosních kapkách Mukoseptonex. [18]

2.5.4 Hovězí sérový albumin (BSA)

Hovězí sérový albumin je globulární protein o molekulové hmotnosti 66 200 Da. Je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem složeným z 583 aminokyselin. Při pH 5 až 7 je řetězec intramolekulárně vázán sedmnácti disulfidickými můstky. Struktura BSA je uvedena na Obr. 18, kde je možné vidět, že molekula BSA je tvořena třemi homologními jednotkami I, II a III, z nichž každá obsahuje dvě podjednotky A a B.



Obr. 18: Hovězí sérový albumin [19]

Hovězí sérový albumin slouží jako zásobní a transportní protein pro mastné kyseliny, aminokyseliny, žlučové soli, kovy, hormony a léčiva. Hlavní vazebná místa se nacházejí

v podjednotkách II A (vazebné místo I) a III A (vazebné místo II). BSA obsahuje také hydrofobní vazebné místo v podjednotce II A.

BSA je snadno rozpustný ve vodě a je možné ho vysrážet pouze neutrálními solemi (např. síranem amonným). Při teplotě nad 50 °C BSA tvoří ireverzibilní hydrofobní agregáty. [19]

2.6 Koloidní disperze

Mezifázová reologie se uplatňuje především při stabilizaci koloidních disperzí fluidních systémů. Jedná se o dvě fáze (kapalina-kapalina, kapalina-plyn), z nichž jedna tvoří disperzní podíl v podobě kapiček/bublinek rozptýlených ve druhé fázi označované jako disperzní prostředí. Mezifázové rozhraní zaujímá v koloidních disperzích velký povrch, který se zvětšuje se zmenšující se velikostí kapiček nebo bublinek disperzního podílu. [12]

2.6.1 Emulze, pěny a jejich stabilizace

Emulze sestávají ze dvou nemísitelných kapalin. Mají využití především v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Povaha emulze nebo pěny jako celku je závislá na chování mezifázového rozhraní mezi disperzním podílem a disperzním prostředím. Toto chování je možné modifikovat použitím povrchově aktivních látek, které se adsorbují na povrch disperzního podílu a stabilizují tak celou soustavu. Stabilizace emulzí a pěn spočívá především v zamezení slučování kapek/bublinek. K tomu se zpravidla používají proteiny v kombinaci s nízkomolekulárními povrchově aktivními látkami. [20]

Nízkomolekulární povrchově aktivní látky jsou důležité především na začátku procesu tvorby pěn a emulzí, protože mají vysokou rychlost difúze, tzn. z roztoku se velmi rychle dostanou na mezifázové rozhraní, snižují jeho povrchové napětí a tím zamezují zpětnému rozdělování fází. Stabilizace pouze nízkomolekulárními povrchově aktivními látkami není příliš účinná, protože interakce mezi molekulami surfaktantů nejsou pevné, viskozita filmů tvořených nízkomolekulárními surfaktanty je velmi nízká, a proto dochází ve velké míře ke slučování kapek/bublin. [20]

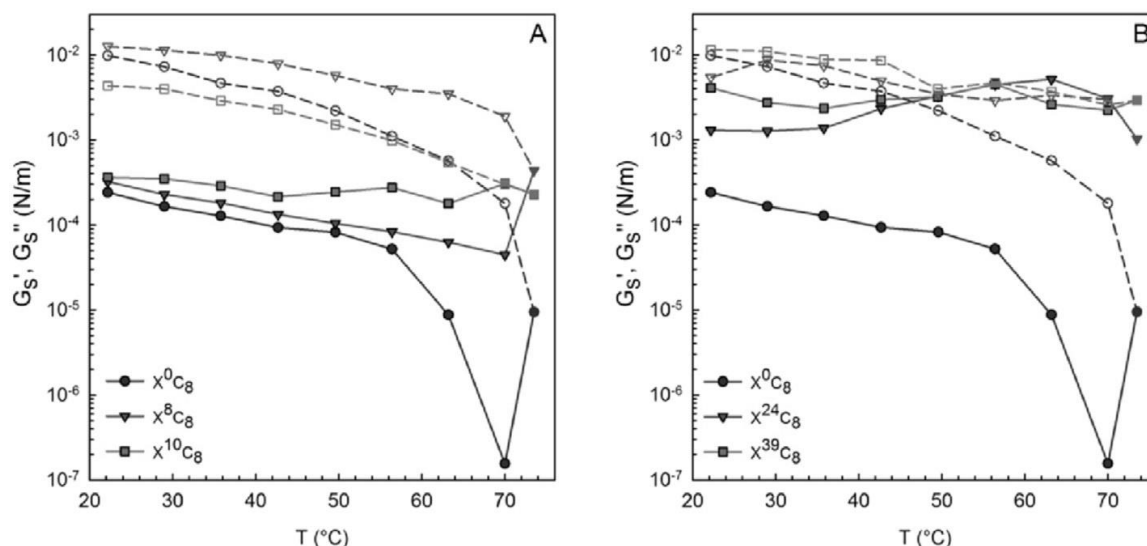
Proteiny mohou být také označovány za povrchově aktivní látky. Na mezifázové rozhraní se adsorbují díky rozmanitosti funkčních skupin aminokyselin, které obsahují jak hydrofobní, tak hydrofilní části. V homogenním roztoku proteiny zaujímají helikální konformaci, při adsorbování proteinů na mezifázové rozhraní ale dochází ke ztrátě přirozené konformace kvůli uspořádání hydrofilních a hydrofobních skupin proteinu. Adsorpcí proteinů na mezifázové rozhraní dochází k jejich denaturaci, což způsobuje ztrátu rozpustnosti ve vodném prostředí a tvorbu mezifázového filmu, který se reologickými vlastnostmi podobá gelu. Proteiny jsou hlavní stabilizační složkou pěn a emulzí, protože interakce proteinů na mezifázovém rozhraní jsou velmi silné (vodíkové můstky, hydrofobní interakce, kovalentní vazby, elektrostatické interakce), tvoří pevný mezifázový film, který obklopuje jednotlivé kapky/bubliny a účinně tak zabraňuje slučování kapek/bublin. Přesto by stabilizace pouze proteiny nebyla velmi účinná, jelikož se jedná o makromolekulární sloučeniny a rychlost difúze je nižší než u nízkomolekulárních surfaktantů stejně jako schopnost snižovat mezifázové napětí. [12], [20]

Při kombinaci proteinů a nízkomolekulárních surfaktantů dochází k tomu, že nízkomolekulární surfaktanty nahrazují vysokomolekulární proteiny na mezifázovém rozhraní, což je nechtěný jev, protože dochází ke snížení tloušťky mezifázové vrstvy i ke snížení její

viskozity. Stabilizační efekt proteinů je tedy z velké části potlačen. Tento problém je v současnosti studován pomocí mezifázové smykové reologie, která umožňuje porovnávat pevnost a stabilitu nejrozličnějších mezifázových vrstev. Bylo například zjištěno, že pokud je protein denaturován pomocí zvýšené teploty již v roztoku, náhrada tohoto proteinu nízkomolekulárním surfaktantem na mezifázovém rozhraní je značně nižší. [20]

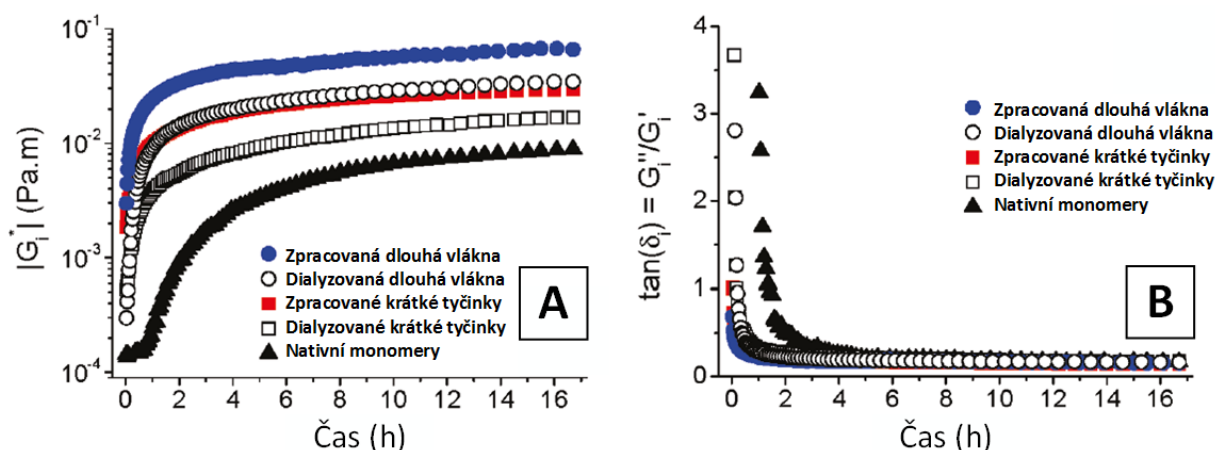
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mezifázová reologie je metoda využitelná pro široké spektrum aplikací. Jednou z nejdůležitějších aplikací posledních let jsou pěny a emulze využívané především v potravinářství a farmacii. Pomocí mezifázové reologie je možné měřit jejich stabilitu a testovat vliv přísady nejrozličnějších emulgátorů a stabilizačních látek. Autoři práce [21] studovali viskoelastické vlastnosti xanthanu a jeho hydrofobně modifikovaných derivátů na rozhraní voda-silikonový olej v závislosti na teplotě v rozmezí 22,2 až 73,5 °C. Tento sacharid zvolili kvůli jeho rozpustnosti ve vodě, biokompatibilitě a biodegradabilitě. Byly připraveny čtyři druhy modifikovaných xanthanů, které se vzájemně lišily počtem hydrofobních skupin (X^8C_8 , $X^{10}C_8$, $X^{24}C_8$ a $X^{38}C_8$), přičemž měření byla prováděna zároveň i s prekurzorem (X^0C_8). Vlastnosti mezifázových rozhraní s jednotlivými modifikovanými xanthany byly zkoumány pomocí metody mezifázové reologie za použití reometru TA DHR-2 s geometrií kroužku a měřicí nádobou s dvojitou stěnou (*DWR-Double Wall Ring*). Před studiem reologických vlastností byly zjištěny konformace zaujaté hydrofobními řetězci pomocí protonové nukleární magnetické rezonance (HNMR), polarimetrie a cirkulárního dichroismu. Autoři zjistili, že reologické vlastnosti hydrofobně modifikovaných xanthanů jsou vysoce závislé na hustotě hydrofobních řetězců. Čím větší počet těchto řetězců modifikovaný xanthan měl, tím vyšší byly hodnoty modulu elasticity a viskózního modulu. Při zahřívání došlo u xanthanu a modifikovaných xanthanů s nízkým počtem hydrofobních řetězců k výraznému poklesu modulu elasticity, což bylo způsobeno ztrátou prostorového uspořádání řetězců. Xanthan zaujímá helikální konformaci, která byla působením teploty porušena. Pomocí polarimetrie bylo potvrzeno, že mezi teplotami 55-70 °C došlo k náhlému porušení této konformace a řetězce se staly neuspořádanými, což způsobilo prudký pokles elastického modulu v tomto teplotním rozmezí. Poté došlo ke stabilizaci řetězců při vysokých teplotách a jejich uspořádání se vracelo zpět do původní konformace, což bylo opět potvrzeno polarimetrií (Obr. 19A). U xanthanů s vysokým počtem hydrofobních řetězců nedošlo k denaturaci téměř vůbec (Obr. 19B). Po ochlazení došlo k částečné renaturaci a celkovému zvýšení hodnot viskoelastických modulů, což bylo nejspíše způsobeno adsorpcí denaturovaných řetězců do mezifázového rozhraní. U hydrofobně modifikovaných xanthanů byly objeveny zajímavé vlastnosti (vysoká hodnota elastického modulu, a především tepelná stabilita), díky kterým by mohly být používány jako emulgátory.



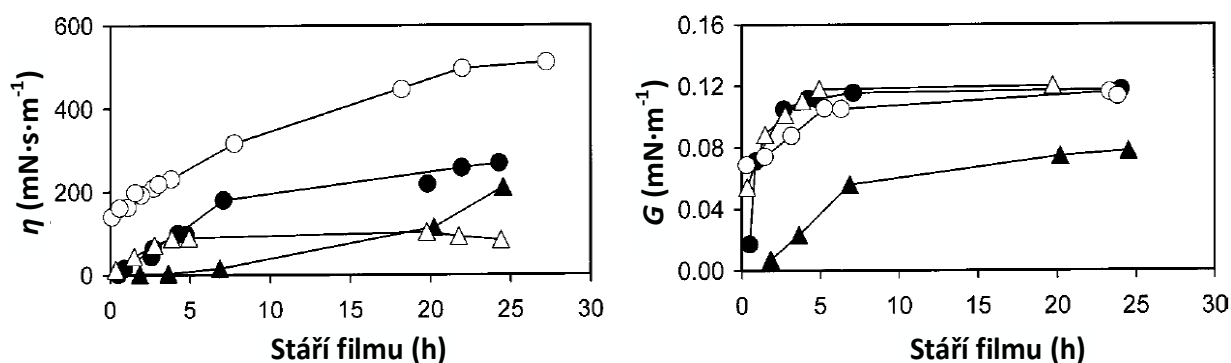
Obr. 19: Vývoj G_s' během zahřívání (plné symboly) a ochlazování (prázdné symboly) pro A: prekursor, X^8C_8 a $X^{10}C_8$ a B: prekursor, $X^{24}C_8$ a $X^{38}C_8$. [21]

Autoři článku [22] se zaměřili na adsorpci syrovátkového proteinu β -laktoglobulinu na mezifázové rozhraní voda-MCT olej (olej, který obsahuje pouze triglyceridy se středně dlouhým řetězcem, tzn. s uhlovodíkovým řetězcem tvořeným šesti až dvanácti uhlíky) z důvodu stability a tvorby pěny v potravinářském průmyslu. V tomto případě byl studován β -laktoglobulin a teplem indukovaná β -laktoglobulinová vlákna dvou délek, dlouhá vlákna měřila 1 až 20 μm a délka krátkých vláken byla 100 až 300 nm. Měření byla realizována při $\text{pH} = 2$, jelikož při tomto pH je β -laktoglobulin v nejvíce disociované formě. Při tomto pH dochází k rapidní protonizaci a z toho důvodu vykazuje monomer β -laktoglobulinu kladný náboj. Zahříváním β -laktoglobulinu při tomto pH dochází ke shlukování monomerů, tj. ke tvorbě agregátů ve tvaru tyčinek (vláken). Vzniká tedy směs monomerů a vláken β -laktoglobulinu. Mezifázová rozhraní byla studována pomocí mezifázové reologie a tenziometrie. Reologická měření byla prováděna přístrojem Physica MCR500 reometr s bikonickou geometrií a byly provedeny následující testy: časový, amplitudový a frekvenční. Výstupem měření byly dvě veličiny, a to komplexní modul $|G_i^*|$ a ztrátový úhel $\tan(\delta_i)$. Měření reologických vlastností mezifázových vrstev bylo zjištěno, že nejvyšší komplexní modul mělo rozhraní obsahující dlouhá β -laktoglobulinová vlákna, zatímco nejnižší byly naměřeny u samotných monomerů β -laktoglobulinu, viz Obr. 20. Bylo také zjištěno, že přítomnost monomerů v systému vláken přispívá k vyšším hodnotám $|G_i^*|$. Filmy vytvořené na mezifázovém rozhraní se chovaly téměř jako pevné látky, tzn. měly čistě elastický charakter. Tuto skutečnost autoři vysvětlují nízkým pH , jelikož se proteiny díky svému kladnému náboji v roztoku odpuzovaly, shromáždily se ve velkém množství na mezifázovém rozhraní.



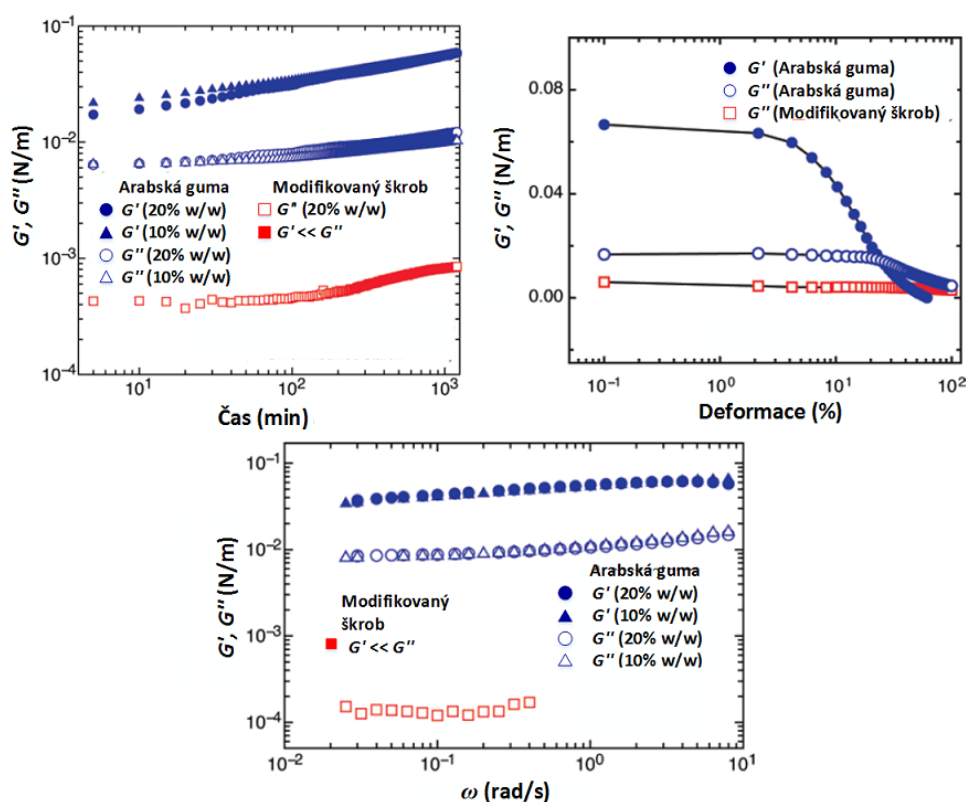
Obr. 20: Vývoj reologických vlastností během adsorpce jednotlivých β -laktoglobulinových systémů: (A) časová závislost komplexního modulu, (B) časová závislost ztrátového úhlu. [22]

β -laktoglobulinem se zabývali také autoři studie [23], kteří studovali efekt změny pH, organické fáze, stárnutí a vliv teploty na β -laktoglobulinový mezifázový film kvůli jeho využití pro přípravu emulzí v potravinářství. Dále byla studována náhrada β -laktoglobulinu na rozhraní povrchově aktivní látkou Tween 20, která se v potravinářství využívá jako emulgátor. Měření mezifázové viskozity a elasticity byla prováděna přístrojem Couette-type mezifázový viskozimetr s bikonickou geometrií. Pro studium mezifázových vlastností rozhraní tvořeného pufrem a různými organickými fázemi si autoři za organické fáze zvolili n-dodekan, purifikovaný triolein a nepurifikovaný triolein. Purifikovaný a nepurifikovaný triolein vykazovaly téměř totožné hodnoty mezifázové viskozity, která byla značně nižší než mezifázová viskozita rozhraní voda-n-dodekan. Při studiu vlivu změny pH bylo zjištěno, že nejvyšší hodnoty mezifázové viskozity byly naměřeny v izoelektrickém bodě β -laktoglobulinu, protože právě v pI vytvářel β -laktoglobulin na rozhraní nejrigidnější síť. Dále bylo zjištěno, že nahrazení β -laktoglobulinu Tween 20 probíhalo nejlépe na rozhraní voda-vzduch a voda-n-dodekan. Efekt teploty na viskoelastické vlastnosti velmi závisel na právě zvoleném pH. Zvýšení teploty také podporovalo rychlost výměny β -laktoglobulinu na mezifázovém rozhraní povrchově aktivní látkou Tween 20.



Obr. 21: Efekt typu rozhraní na mezifázovou viskozitu η a mezifázovou elasticitu G (pH = 5,6; $T = 20$ °C): (○) n-dodekan-voda, (●) čištěný triolein-voda, (Δ) nečištěný triolein-voda, (▲) vzduch-voda [23]

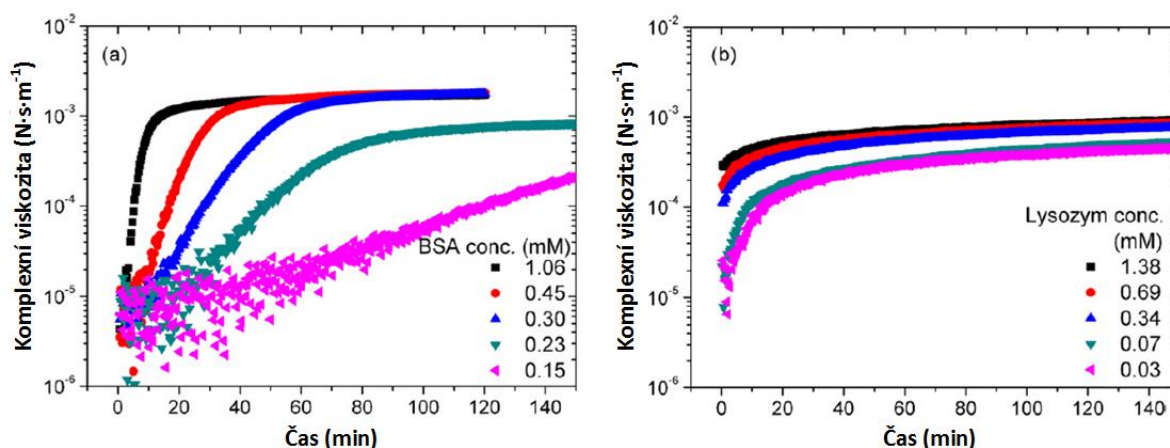
Autoři práce [24] zkoumali vlastnosti mezifázového filmu tvořeného arabskou gumou na rozhraní olej-voda, které porovnávali s vlastnostmi rozhraní tvořeného hydrofobně modifikovaným škrobem. Tyto dvě látky byly ke studiu vybrány, protože modifikovaný škrob bývá v potravinářství často využíván jako náhrada arabské gumy, především kvůli své nízké ceně. Bylo měřeno mezifázové napětí pomocí tenziometrie a modul elasticity a viskózní modul pomocí mezifázové reologie. Reologická měření byla realizována na přístroji Physica MCR 300 reometr s bikonickou geometrií. Z hlediska viskoelasticity byly měřeny vlastnosti arabské gumy i hydrofobně modifikovaného škrobu ve dvou různých koncentracích ve vodné fázi pomocí časových testů (závislost viskózního a elastického modulu na čase při konstantní frekvenci a deformaci), další testy byly provedeny po dvaceti hodinách stárnutí filmů, a to amplitudový (závislost viskózního a elastického modulu na míře deformace při konstantní frekvenci) a frekvenční (závislost viskózního a elastického modulu na frekvenci při konstantní deformaci) test. U arabské gumy byly jen velmi malé rozdíly v obou modulech pro obě koncentrace a hodnoty modulů byly ve srovnání s modifikovaným škrobem vysoké, viz Obr. 22. Moduly mezifázové vrstvy tvořené modifikovaným škrobem se nacházely pod mezí detekce přístroje kromě viskózního modulu s vyšší koncentrací modifikovaného škrobu ve vodné fázi. Zatímco v případě arabské gumy oba moduly rostly v čase téměř lineárně, v případě hydrofobně modifikovaného škrobu byl viskózní modul konstantní první tři hodiny a až po této době byl pozorován mírný nárůst. Podle autorů to bylo způsobeno jistou mírou gelace. Arabská guma tedy tvořila silný viskoelastický mezifázový film, zatímco mezifázová vrstva tvořena hydrofobně modifikovaným škrobem měla za všech okolností viskózní charakter.



Obr. 22: Zleva časový test, amplitudový test a frekvenční test pro dvě různé koncentrace arabské gumy a hydrofobně modifikovaného škrobu [24]

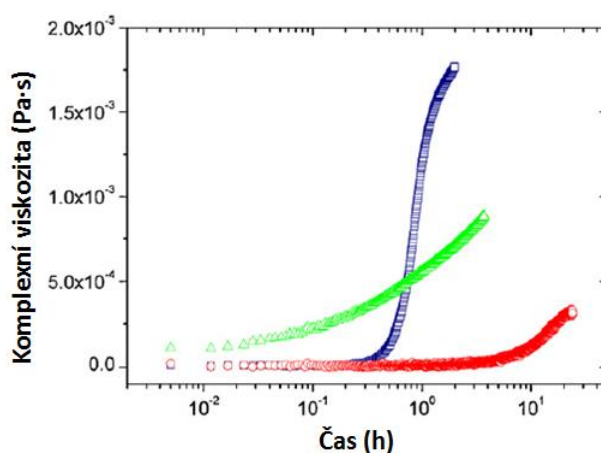
Autoři článku [25] studovali strukturu a reologické vlastnosti fosfolipidové vrstvy na mezifázovém rozhraní kapalina-vzduch. Fosfolipidy mohou být využity v potravinářském průmyslu k přípravě pěn nebo disperzí. V rámci studie zkoumali efekt struktury uhlovodíkového řetězce a elektrostatických interakcí na uspořádání molekul mezifázové vrstvy a její reologické vlastnosti. Povrchový film byl tvořen dipalmitoylfosfatidylcholinem (DPPC) a 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholinem (DOPC) ve směsi chloroformu a ethanolu, který byl rozprášen na vodnou fázi. K dosažení pH 5 byl použit vodný roztok $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, k dosažení pH 7 a 9 byl použit roztok $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2/(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_3\text{Cl}$. Měření byla provedena pomocí povrchové váhy, pomocí které byl změřen povrchový tlak a průměrná plocha, kterou zaujímá jedna molekula. Dilatační elastický a viskózní modul byl změřen pomocí mezifázové dilatační reologie. Smykový elastický a viskózní modul byly změřeny pomocí smykové mezifázové reologie s využitím přístroje Camtel CIR 100 s geometrií kroužku. Bylo zjištěno, že vyšší viskoelastické moduly dosahovaly filmy tvořeny DPPC s nasyceným uhlovodíkovým řetězcem, než filmy s DOPC, který má uhlovodíkový řetězec nenasyčený. Smykové moduly byly na rozdíl od dilatačních modulů velmi závislé na pH. Při pH 5 byly moduly nejvyšší vzhledem k přitažlivým van der Waalovým silám, při pH 9 působily síly odpuzivé, což oslabovalo strukturu fosfolipidové vrstvy, a proto byly moduly při tomto pH nejnižší.

Další důležitou oblastí, ve které se mezifázová reologie využívá, je studium proteinů pro medicínské účely, především pro přípravu nosičových systémů léčiv. Autoři studie [26] se zabývali adsorpcí tří různých proteinů, a to hovězího sérového albuminu (BSA), lysozymu ze slepičích vajec a lidského inzulinu na rozhraní voda-olej. Vodné roztoky jednotlivých proteinů byly připraveny o různých koncentracích. Reologické vlastnosti těchto adsorpčních vrstev byly měřeny pomocí mezifázové reologie za použití přístroje TA AR-G2 s geometrií kroužku. Dále byla použita tenziometrie pro stanovení mezifázového napětí, které bylo měřeno jako srovnávací veličina. Komplexní viskozita byla proměřena pro každou koncentraci v závislosti na čase. Podle naměřených hodnot rozdělili adsorpci proteinů do mezifázového rozhraní do třech režimů: v prvním režimu adsorpce neprobíhala a naměřené hodnoty byly konstantní, druhý režim představoval tvorbu jednovrstvého filmu, během čehož došlo k výraznému nárůstu viskoelastických modulů a ve třetím režimu probíhala pomalá tvorba dalších vrstev filmu, při které už moduly zůstávaly téměř konstantní. Naměřená data dále prokázala závislost viskoelastických vlastností adsorpční vrstvy proteinů na jejich koncentraci, což je patrné z Obr. 23.



Obr. 23: Závislost adsorpce na koncentraci: (a) BSA a (b) lysozym. Použité koncentrace jsou uvedeny v grafech. [26]

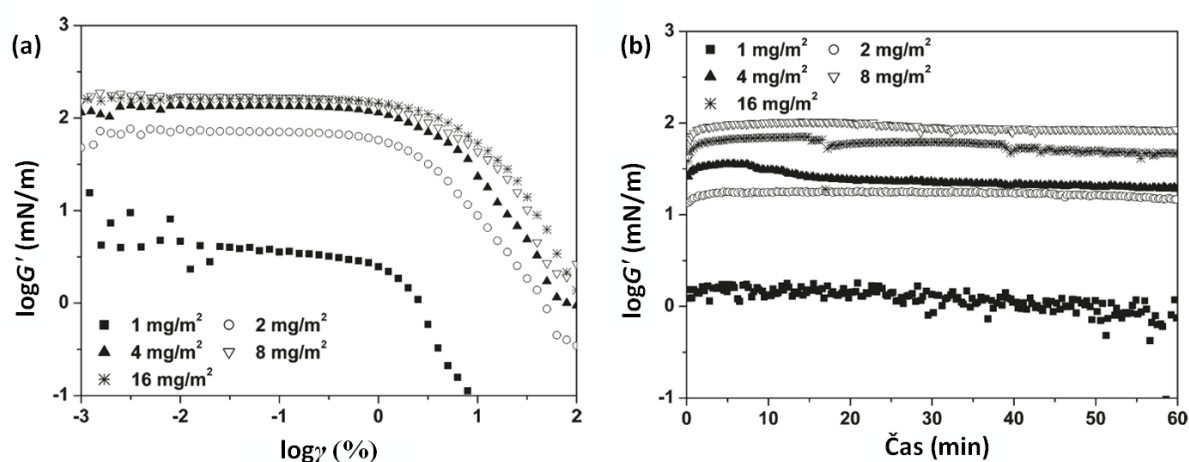
S rostoucí koncentrací proteinů ve vodné fázi docházelo ke zvyšování adsorbovaného množství na mezifázové rozhraní. Na Obr. 23 je také vidět, že maximální dosažená komplexní viskozita i doba, za kterou bylo maximální komplexní viskozity dosaženo, jsou závislé na koncentraci. Autoři zjistili, že velké molekuly se adsorbují na mezifázového rozhraní lépe než malé molekuly. Adsorpce je tedy závislá na molekulové hmotnosti. Ze zkoumaných proteinů měl největší molekulovou hmotnost BSA a nejmenší inzulin, což souhlasí s naměřenými výsledky (Obr. 24). Nejstrmější nárůst komplexní viskozity byl zaznamenán u BSA, který dosáhl třetího režimu s nejvyšší komplexní viskozitou po dvou hodinách, zatímco inzulin dosáhl třetího režimu po dvaceti čtyřech hodinách, přičemž jeho maximální dosažená komplexní viskozita byla ze všech tří proteinů nejnižší. Z naměřených výsledků bylo usouzeno, že metoda mezifázové reologie je účinná pro charakterizaci různých proteinů, díky čemuž by mohlo být možné navrhnout vhodné postupy pro přípravu nosičových systémů.



Obr. 24: Časová závislost adsorpce BSA (0,30 mM, modrá barva), lysozymu (0,34 mM, zelená barva) a inzulinu (0,50 mM, červená barva). [26]

Autoři další práce [27] se zabývali studiem hedvábí produkovaného bourcem morušovým. Toto hedvábí se prokazuje vynikajícími mechanickými vlastnostmi, výbornou biokompatibilitou, nízkou biodegradabilitou a minimální zánětlivou reakcí, díky těmto vlastnostem by mohlo být využíváno v kontrolovaném uvolňování léčiv a tkáňovém

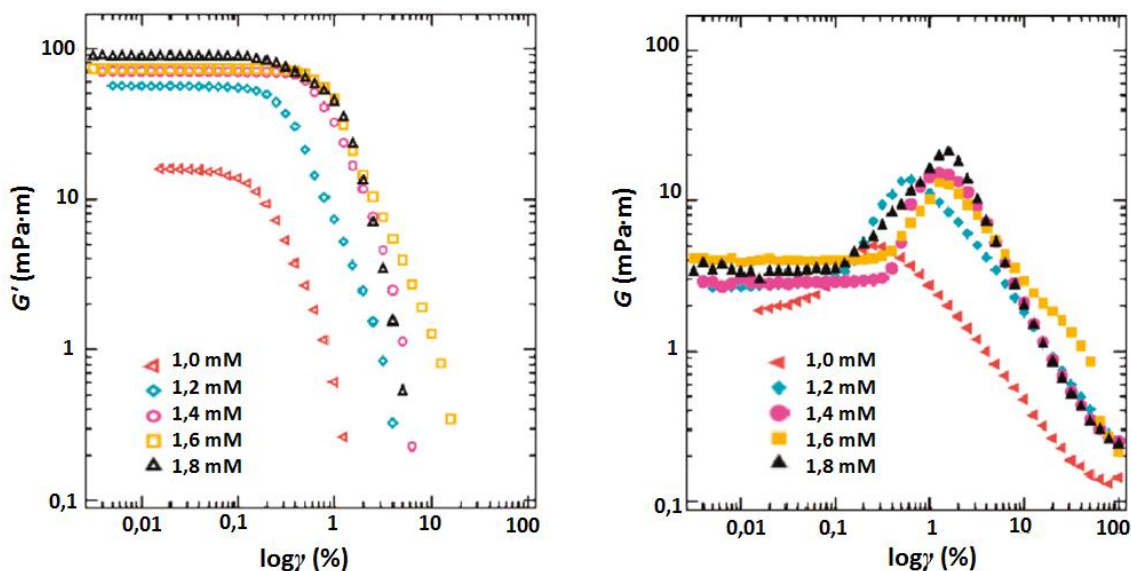
inženýrství. Autoři se proto zabývali schopností hedvábného fibroinu tvořit silné gely na rozhraní vzduch-voda a olej-voda se třemi různými organickými fázemi o různých polaritách (dodekan, butyl butyrát a hexanol). Morfologie vzniklých filmů byla pozorována pomocí optické mikroskopie a analýzy rozptylu světla. Viskoelastické vlastnosti vytvořených gelů s různými koncentracemi hedvábného fibroinu ve vodné fázi byly měřeny pomocí mezifázové reologie s použitím přístroje TA AR-G2 s geometrií kroužku. Bylo provedeno několik testů: časový test, frekvenční test a amplitudový test. Nejprve byly provedeny testy amplitudový a frekvenční, poté následoval časový test pro zjištění, zda je deformace trvalá nebo alespoň částečně vratná. Autoři zjistili, že film vytvořený hedvábným fibroinem na rozhraní voda-vzduch je velmi pevný a modul elasticity je mnohem vyšší než u filmů vytvořených jinými dříve studovanými proteiny, např. lysozymem nebo inzulinem. Amplitudové testy prokázaly při $\gamma = 1\%$ porušení struktury filmu, které se projevilo prudkým poklesem elastického modulu (Obr. 25(a)). Ukázalo se, že viskoelastické vlastnosti fibroinového filmu na rozhraní olej-voda, jsou velmi závislé na typu organické fáze, při použití dodekanu byl modul elasticity téměř $6,3\times$ větší, než při použití hexanolu. Obecně se modul elasticity zvyšoval v závislosti na koncentraci fibroinu (Obr. 25). Zjištěné vlastnosti naznačují, že by hedvábný fibroin mohl mít významný potenciál v systému podávání léčiv a v kosmetice jako efektivní emulgátor.



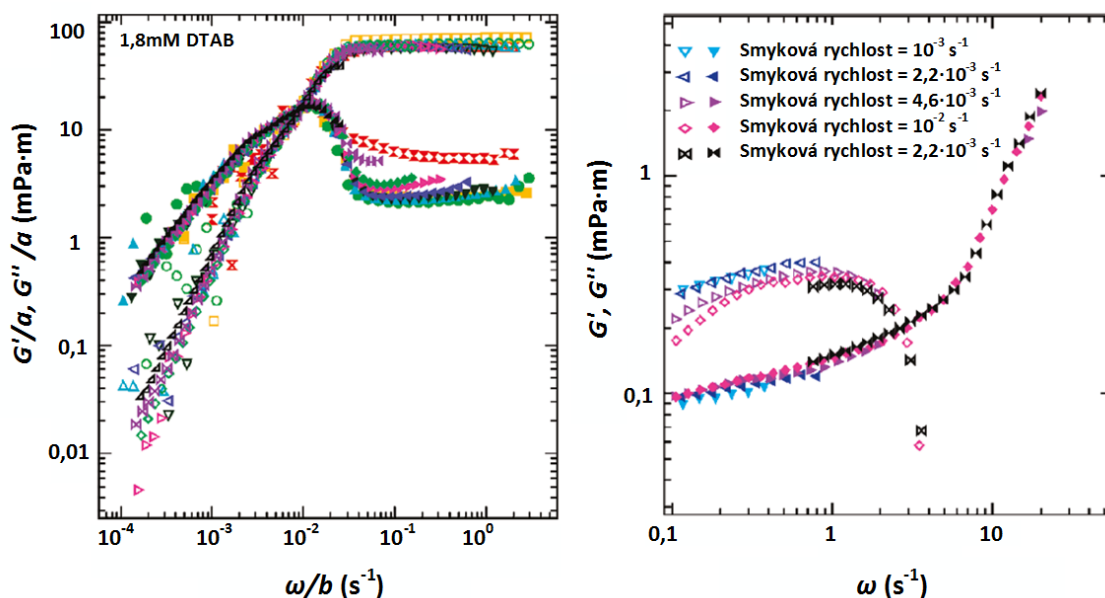
Obr. 25: (a) Amplitudový test pro různé povrchové koncentrace a (b) časový test po provedení amplitudového testu [27]

Autoři studie [28] se zabývali reologickým chováním povrchů tvořených povrchově aktivní látkou (dodecyl)trimethylamonium-bromid (DTAB) a třemi různými polyelektrolyty: poly(2-akrylamido-2-methylpropansulfonová kyselina) (PAMPS), karboxymethylcelulóza (CMC) a DNA. Směsi polymer-povrchově aktivní látka mohou být použity pro enkapsulační účely, například komplexy malých lipidů s DNA mohou proniknout do buňky a sloužit jako nosiče v genové terapii. Mezifázové filmy těchto směsí byly sledovány pomocí mezifázové reologie s využitím přístroje Anton Paar Physica model MCR-301 reometr s bikonickou geometrií, byla měřena i tloušťka filmu pomocí elipsometrie. Pro jednotlivé filmy byl proveden amplitudový test, následně byl proveden test, při kterém docházelo k nárůstu deformace a zároveň byla snižována frekvence. Z reologického hlediska všechny tři vrstvy vykazovaly velmi rozdílné viskoelastické vlastnosti. Autoři zjistili, že vrstva DNA-DTAB se chová jako měkká pevná látka, kdy nejvyšší modul elasticity byl dosažen s nejvyšší koncentrací DTAB,

což bylo určeno ze závislosti na Obr. 26 vzhledem k linearitě modulů v nejvyšších frekvencích. Ze všech tří polymerů (DNA, CMC, PAMPS) vykazuje struktura DNA největší tuhost. Mezifázové vrstvy tvořené CMC-DTAB vykazovaly také spíše elastické vlastnosti jako vrstvy DNA-DTAB, ale rozsah modulu elasticity byl zhruba o dva řády menší, což je patrné z porovnání Obr. 26 a Obr. 27. Posledními studovanými vrstvami byly vrstvy tvořené PAMPS-DTAB. PAMPS je ze všech polymerů nejflexibilnější a vrstvy měly čistě viskózní charakter.



Obr. 26: Časový test pro film CMC-DTAB: G' (prázdné symboly – levý graf), G'' (plné symboly – pravý graf) [28]



Obr. 27: Závislost G' (prázdné symboly) a G'' (plné symboly) na frekvenci pro film tvořený DNA a DTAB o $c = 1,8$ mM (vlevo) a pro film tvořený CMC a DTAB o $c = 2,5$ mM (vpravo) [28]

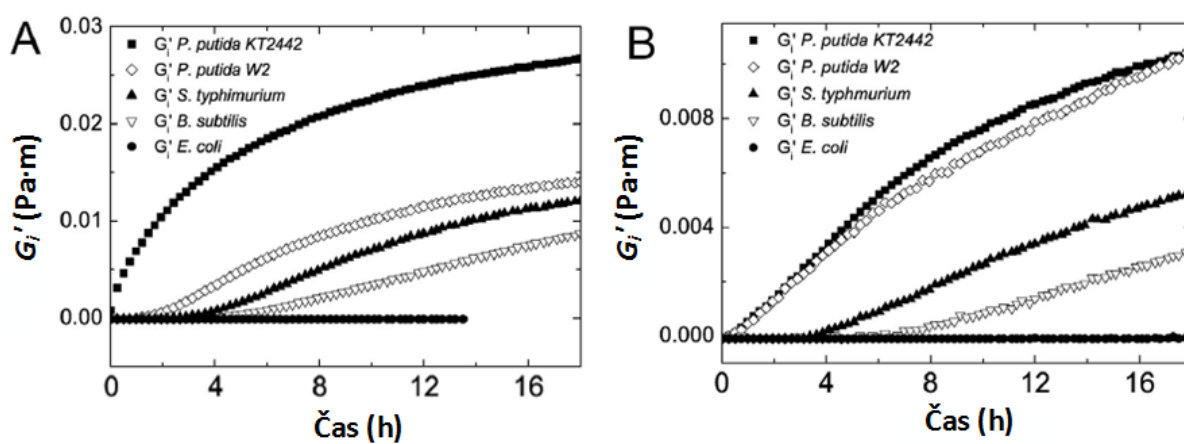
Další možností využití této metody je studium některých dějů probíhajících na buněčné membráně, která představuje jedno z nejdůležitějších rozhraní vůbec. Autoři článku [29] se zabývali studiem procesu biomineralizace na rozhraní olej-voda, které má představovat

velmi zjednodušenou verzi buněčné membrány, přičemž vodná fáze obsahovala hydrogenuhličitan vápenatý a olejová fáze sestávala ze stearové kyseliny v dodekanu nebo toluenu. Vlastnosti fázového rozhraní těchto dvou nemísitelných roztoků byly měřeny pomocí skenovací elektronové mikroskopie, rentgenové práškové difraktometrie, mezifázové reologie, infračervené spektroskopie a dynamického rozptylu světla. Mezifázová reologie byla studována pomocí reometrického fluidního spektrometru, který byl vybaven bikonickou geometrií. Byly provedeny testy časové, amplitudové a frekvenční. Elastický film vznikl v rozmezí 12 až 24 hodin od začátku měření. Při tvorbě filmu byl zaznamenán výrazný nárůst modulu pružnosti i viskózního modulu, což bylo nejspíše zapříčiněno tvorbou krystalků. Po počátečním růstu filmu došlo k mírnému poklesu obou modulů, zvláště viskózního modulu. Po třech dnech byly oba moduly konstantní. Autoři článku došli k závěru, že filmy s permanentní sítovou strukturou vykazují především elastické vlastnosti, s výjimkou měření při vysoké úhlové rychlosti, kdy viskózní modul vzrůstal a prokazoval tak skelný charakter filmu. Dále bylo zjištěno, že výběr organického rozpouštědla měl vliv na tloušťku a dobu tvorby filmu, což bylo způsobeno nejspíše rozdílnými fyzikálními vlastnostmi. Autoři předpokládají, že tvrdost filmu byla zapříčiněna difúzí uhličitanu vápenatého z vodné do organické fáze, ve které se molekuly stearové kyseliny adsorbovaly na tenkou vrstvu uhličitanu vápenatého.

Jak už bylo zmíněno výše, jedny z nejdůležitějších rozhraní představují buněčné membrány, na kterých se odehrává většina biologických dějů. Autoři článku [30] studovali právě jeden z těchto procesů, konkrétně lipolýzu. Cílem jejich práce bylo prostudovat efekt produktů lipolýzy na mezifázové vlastnosti lipáz, jelikož tyto produkty s nízkou molekulovou hmotností mohou vytěšňovat lipázy o vysoké molekulové hmotnosti z mezifázové vrstvy. Autoři si pro studium vybrali mezifázové rozhraní voda-olej a lipázy s různou regiospecifitou (Sn-1,3 a bez regiospecifity). Vlastnosti rozhraní byly měřeny pomocí tenziometrie, elipsometrie a mezifázové reologie. K reologickým měřením byl použit přístroj ISR 1 s bikonickou geometrií. Autoři pomocí mezifázové reologie zjistili, že pouze Sn-2 monoglycerid (produkt hydrolýzy katalyzované Sn-1,3 lipázou) měl dostatečnou energii, aby nahradil lipázu na mezifázovém rozhraní. Hydrolýza katalyzovaná lipázou bez regiospecifity dala vznik mastným kyselinám a glycerolu, které neměly dostatečnou energii pro nahrazení lipázy. Pro rozhraní tvořené Sn-1,3 lipázou se elastický modul v čase stále zvyšoval, což dokazovalo zvětšující se tloušťku vrstvy. Pomocí zmíněných metod bylo zjištěno, že lipázy nahrazené Sn-2 monoglyceridem tvoří ve vodné fázi druhou vrstvu přímo pod vrstvou monoglyceridů, což potvrdilo narůstající tloušťku mezifázového filmu.

Mezifázová reologie se neomezuje pouze na adsorpci látek na úrovni jednotlivých molekul, ale je možné s jejím využitím pozorovat i chování některých biologických systémů, zejména bakterií. Autoři práce [31] sledovali tvorbu biofilmu u pěti různých bakterií na rozhraní olej-voda. Použili následující bakterie: *P. putida* KT2442, *P. putida* W2, *S. typhimurium*, *E. coli* a *B. subtilis*. Tvorba biofilmů byla sledována pomocí mezifázové reologie, tenziometrie a světelné a konfokální laserové mikroskopie. Reologické testy byly provedeny na reometrech Physica MCR300 a MCR501 s bikonální geometrií. Pro provedení experimentů byly bakterie nejprve kultivovány, poté centrifugovány a dvakrát promyty ve fosfátovém pufru, což představovalo vodnou fázi při měření. Tvorba biofilmu byla pozorována pomocí časového testu. Testy byly provedeny na dvou různých rozhraních, a to fosfátový pufr-minerální olej

a fosfátový pufr-MCT olej (olej, který obsahuje pouze triglyceridy se středně dlouhým řetězcem). Byla měřena především závislost elastického modulu G' , jelikož jeho nárůst odpovídá množství bakterií adsorbovaných na mezifázové rozhraní. Autoři zjistili, že nejvíce se na rozhraní adsorbovala bakterie *P. putida* KT2442 a nejméně *E. coli*. Celkové pořadí jednotlivých bakterií je zobrazeno v Obr. 28 a odpovídá i nárůstu hydrofobicity daných mikroorganismů. Experimenty bylo zjištěno, že všechny bakterie kromě *P. putida* KT2442 se adsorbovaly ve stejném množství v případě obou druhů olejů. Výrazně vyšší elastický modul u *P. putida* KT2442 na rozhraní s minerálním olejem byl způsoben pravděpodobně tím, že některé bakterie v kontaktu s dekany, které jsou přítomné v minerálním oleji, postupně uvolňují povrchově aktivní látky, což je vzhledem k naměřeným výsledkům případ *P. putida* KT2442.

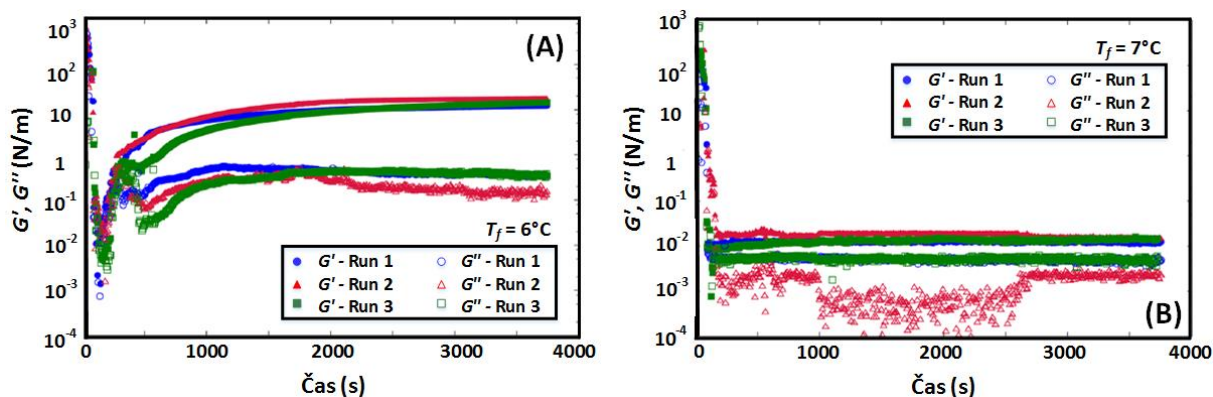


Obr. 28: Závislost elastického modulu G' na čase: (A) s minerální olejem, (B) s MCT olejem [31]

V této části studie tvorba biofilmu na rozhraní neproběhla, jelikož tvorba biofilmu je pro bakterie ochrannou funkcí. Ve druhé části práce autoři aplikovali na adsorbované bakterie (*P. putida* KT2442, *S. typhimurium*, *E. coli*) větší procento deformace. V tomto případě byla pozorována tvorba biofilmu u všech tří bakterií jako reakce na zvýšený mechanický stres. Adsorpce bakterií na mezifázové rozhraní je důležitá zejména pro potravinářský průmysl, protože olej a proteiny jsou vhodným prostředím pro vznik biofilmu a je třeba odhadnout stupeň kontaminace hydrofobního prostředí bakteriemi.

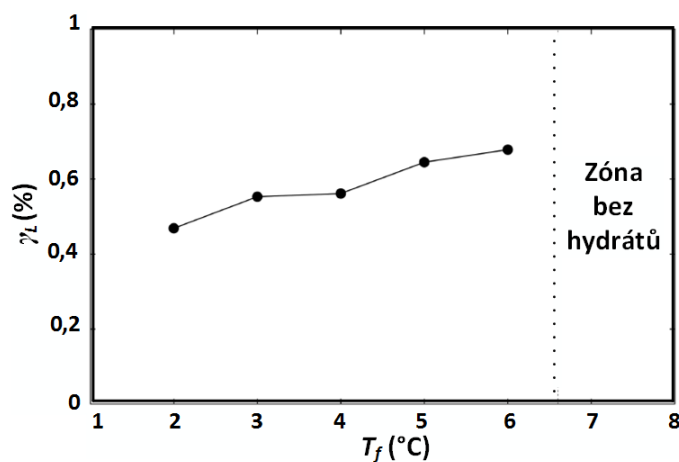
Metoda našla uplatnění i mimo medicínu, potravinářský nebo farmaceutický průmysl. Autoři článku [32] studovali tvorbu cyklopentanových klatrátů na rozhraní voda-cyklopentan. Výzkum byl prováděn kvůli špatnému průtoku plynů a olejů podmořským potrubím, který byl pravděpodobně způsobován tvorbou klatrátů. Klatráty se tvoří na rozhraní voda-uhlovodík pouze za určitých podmínek. Jedná se o klastry tvořené molekulami vody spojenými vodíkovými můstky, které jsou vyplněny molekulami uhlovodíku, v tomto případě cyklopentanu. Autoři tedy studovali pomocí mezifázové reologie, za jakých podmínek se klatráty vytvoří. K měření použili reometr TA DHR-3 s geometrií kroužku a měřicí nádobou s dvojí stěnou (DWR-Double Wall Ring). Během studie byly proměřeny závislosti G' a G'' na čase při sedmi finálních teplotách (2 až 8 °C) a každé měření bylo třikrát zopakováno, dále byl při teplotách, při kterých se vytvořily klatráty, proveden amplitudový test. Bylo zjištěno, že k tvorbě klatrátů docházelo pouze, pokud vodná fáze byla v pevném skupenství (led) při

přidávání cyklopentanu na její povrch. Vzorky byly poté zahřívány na finální teplotu. Nejvyšší teplota, při které byly klatráty na rozhraní přítomny, se pohybovala mezi 6 a 7 °C (Obr. 29).



Obr. 29: Časová závislost G' a G'' při 6 °C a při 7 °C. [32]

Vzniklé mezifázové filmy byly velmi křehké, ale tuhé. Jejich tuhost se zvyšovala spolu s finální teplotou, což autoři zjistili podle sestrojené závislosti kritické deformace na finální teplotě, viz Obr. 30. S finální teplotou se také zvyšoval čas, za který se klatrátový film vytvořil.



Obr. 30: Závislost kritické deformace na finální teplotě. [32]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich) – čistota $\geq 98\%$, č. š. SLBJ2586V

Septonex

Toluen (Sigma Aldrich) – čistota p.a., max. 1 % nečistot, č. š.: 150404

Chloroform (Sigma Aldrich) – čistota p.a., stabilizovaný 1% ethanolem, č. š.: 200740514

Demineralizovaná voda

4.2 Použité přístroje

Reometr – AR-G2 Rheometer (TA) Instruments

Analytické váhy – Denver Instrument

4.3 Péče o senzory

Před každým měřením je třeba senzor vyšroubovat a očistit. Kroužek se čistí plamenem tak, že se dá do plamene kahanu a počká se, než je celý kroužek žhavý (oranžový), poté se našroubuje zpět na rotor přístroje. Bikonický senzor se neopaluje, stačí, když se pořádně otre buničinou, ale je třeba dát pozor na to, aby na senzoru nezůstala vlákna z buničiny.

4.4 Rozhraní kapalina-kapalina

4.4.1 Amplitudové a frekvenční testy – postup měření

Postup měření s geometrií kroužku na rozhraní kapalina-kapalina je představen na příkladu mezifázového rozhraní chloroform-voda.

Ze všeho nejdříve musel být přístroj uveden do chodu. Nejprve byl zapnut přívod vzduchu, poté cirkulace vody, následovalo zapnutí samotného reometru a spuštění softwaru *Rheology Advantage Instrument Control AR*. Poté byla v softwaru nastavena teplota vyhřívání spodní stacionární desky Peltier na 25 °C. Na rotor přístroje byla našroubována měřicí geometrie (platinový kroužek), v záložce Geometry byl vybrán senzor *Du Noüy Ring* a bylo spuštěno mapování senzoru. Po dokončení mapování byla nastavena nulová poloha senzoru. Důležitým krokem bylo nastavení měřicího módu na *Soft* v záložce nastavení přístroje, ložiskový mód, protože mezifázová rozhraní jsou tvořena pouze tenkou vrstvou molekul nebo buněk a je nutné, aby citlivost přístroje byla při měření jejich viskoelastických vlastností co nejvyšší.

Poté bylo odpipetováno 40 ml chloroformu a opatrně nadávkováno do měřicí nádoby, aby nedošlo k vytvoření bublin. Na chloroform byla nadávkována vrstva demineralizované vody pomocí kapátka. Vzorek byl umístěn do přístroje a následně byl senzor umístěn na rozhraní obou kapalin.

Nejprve byl měřen amplitudový test. V záložce *Oscillation Procedure* byl vybrán *conditioning step* pro relaxaci vzorku na 3 minuty a amplitudový test, který byl nastaven následovně: rozsah amplitudy deformace 0,1 až 1000 %, frekvence oscilací 1 Hz, mód logaritmický, 6 bodů na dekádu. Poté byl test spuštěn. Po ukončení testu byl senzor z přístroje vyšroubován a opálen v plameni.

Druhým testem byl test frekvenční, opět byl s tímto testem vybrán i conditioning step pro relaxaci vzorku (3 minuty). Pro nastavení tohoto testu bylo potřeba určit limitní amplitudu deformace z amplitudového testu. Po určení hodnoty γ_L bylo nastavení testu následující: rozsah frekvence 0,01 až 20 Hz, amplituda deformace 0,5 %, mód logaritmický, 6 bodů na dekádu.

Výstupy z měření byly analyzovány pomocí softwaru *Rheology Advantage Data Analysis* a pomocí MS Excel.

Postup měření pro rozhraní voda-toluen byl stejný jako v případě chloroform-voda, v tomto případě ale fázi s vyšší hustotou tvořila voda a fázi s nižší hustotou tvořil toluen.

4.5 Rozhraní kapalina-vzduch

4.5.1 Příprava vzorků

Byly připraveny čtyři roztoky septonexu o koncentracích $0,0002 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,0006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,0008 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (CMC) a $0,0012 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Každý roztok byl připraven v objemu 200 ml z množství septonexu uvedeného v Tab. 2.

Tab. 2: Navážky septonexu pro přípravu 200 ml roztoku o daných koncentracích

$c \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3})$	$m \text{ (g)}$
0,0002	0,0169
0,0006	0,0507
0,0008	0,0708
0,0012	0,1014

4.5.2 Squeeze test – nastavení

Tento test se využívá pro stanovení polohy mezifázového rozhraní při použití bikonického senzoru. Nastavení testu se nachází v záložce *Oscillation Procedure*. Pro 100 ml fáze o vyšší hustotě je nastavení *squeeze* testu následovné: počáteční poloha 21 000 μm , konečná poloha 14 500 μm , krok 100 μm , rychlost 600 $\mu\text{m}/\text{min}$.

4.5.3 Amplitudové a frekvenční testy – postup měření

Měření rozhraní kapalina-vzduch probíhalo s bikonickou geometrií. Nejprve bylo třeba vykonat veškeré úkony pro zapnutí reometru (viz. kap. 4.4.1). Poté byla z přístroje odebrána Peltierova deska a byla vyměněna za podstavec na měřicí nádobu pro bikonický senzor, vzorek tudíž nebyl temperován. Poté byl na přístroj našroubován bikonický senzor, v záložce *Geometry* bylo vybráno *Manual Factors* a senzor byl mapován. Poté byla do podstavce vložena prázdná měřicí nádoba, následovalo nastavení nulové polohy stejně jako v případě kroužku, v tomto případě ale nastavení probíhá přímo se senzorem.

Poté bylo do měřicí nádoby napipetováno 100 ml vodného roztoku septonexu o koncentraci $0,0006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, která je nižší než CMC. Hledání mezifázového rozhraní bylo realizováno podle bodu 5.2.2. Poté byla poloha senzoru nastavena na vypočtenou hodnotu.

Nejprve byly provedeny amplitudové testy, jejichž nastavení bylo následující: rozsah amplitudy deformace 0,1 až 6200 %, frekvence oscilací 1 Hz, logaritmický mód, 6 bodů na

dekádu. Frekvenční testy byly nastaveny v rozsahu frekvence 0,1 až 100 Hz, 1 % amplitudy deformace, logaritmický mód, 6 bodů na dekádu.

4.6 Hovězí sérový albumin (BSA)

Vzorek o koncentraci $0,00015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven navážením 1,9927 g BSA na analytických vahách a rozpuštěním v 200 ml demineralizované vody. Postup měření byl identický s postupem měření popsáním v kapitole 4.5.3.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výběr geometrie

V této práci byly použity dvě různé geometrie, a to platinový kroužek a bikonický senzor. Kroužek se využívá hlavně při měření viskoelastických vlastností velmi viskózních a skelných (vyznačujících se vysokou pevností a křehkostí) mezifázových vrstev, jelikož na rozdíl od níže uvedeného senzoru disponuje nižší hmotností a tím pádem nezpůsobí deformaci skelných mezifázových rozhraní. Jeho nevýhodou je kulatý tvar, na který se mezifázová vrstva špatně uchycuje a může prokluzovat. Další nevýhodou tohoto senzoru je to, že se díky své lehké konstrukci může snadno poničit. Velkou výhodou oproti bikonické geometrii je menší množství vzorku potřebné pro jedno měření, většinou 10 až 20 ml jedné fáze. To je způsobeno především tím, že kroužek má mnohem menší plochu než bikonický senzor a je tím pádem citlivější.

Bikonická geometrie je na rozdíl od kroužku poměrně robustní a proto je vhodná pro mezifázové vrstvy s převahou elastické složky. Výhodou tohoto senzoru je ostrá hrana, na kterou se mezifázové rozhraní snadněji přichytí. Vzhledem k velikosti a tím pádem i jeho citlivosti je zapotřebí větší množství vzorku, okolo 100 ml, aby byla vyvolána potřebná odezva. Nejdříve tedy bylo nutné obě metody otestovat a naučit se s nimi pracovat. Z toho důvodu budou další kapitoly věnovány poměrně rozsáhlé optimalizaci procesu mezifázové reologie.

5.2 Mezifázové rozhraní – stanovení měřicí polohy

5.2.1 Platinový kroužek

Při použití tohoto senzoru hledá mezifázové rozhraní operátor přístroje manuálně. Měření probíhá v průhledné skleněné nádobě o definovaném objemu. Nejprve je určena nulová poloha senzoru, aby byla známa přesná pozice rozhraní a experiment byl reprodukovatelný. Při samotném určování mezifázového rozhraní se do měřicí nádoby nejprve umístí potřebný objem fáze o vyšší hustotě (většinou vodný roztok obsahující zkoumanou látku), ta se umístí pod senzor, kterým se pomocí softwaru *Rheology Advantage Instrument Control AR* sjíždí až na hladinu roztoku. Kroužek se musí hladiny dotýkat celým svým obvodem a musí být zřetelné, že se celou svojí plochou vyskytuje na mezifázovém rozhraní.

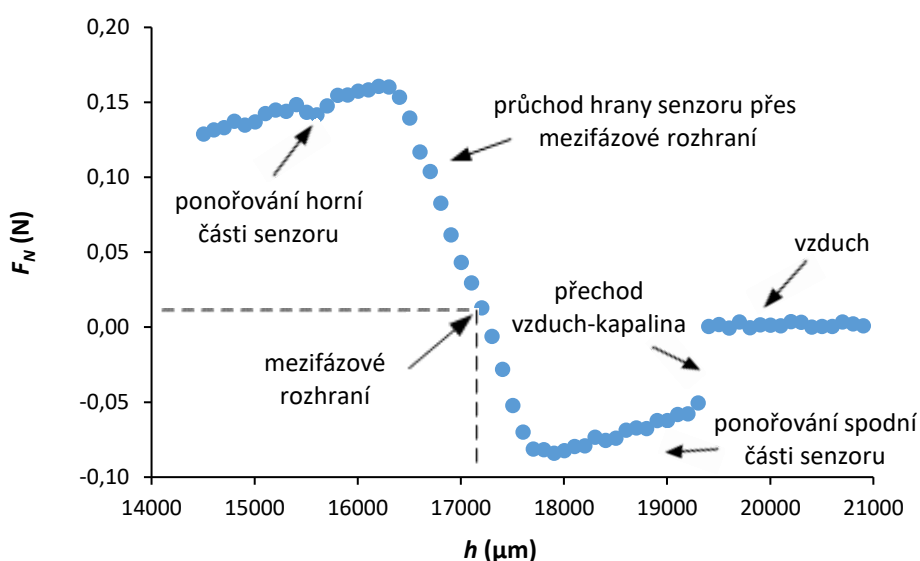
Pokud se jedná o měření rozhraní kapalina-vzduch, je takto připravený vzorek nachystaný k měření. Pokud se jedná o rozhraní kapalina- kapalina, je na hladinu takto připraveného vzorku opatrně přidána kapalina o menší hustotě minimálně v takovém množství, aby byl celý kroužek ponořený.

5.2.2 Bikonický senzor

Při použití bikonického senzoru není možné hledat mezifázové rozhraní opticky, protože měření probíhá v neprůhledné nádobě. Využívá se proto hledání rozhraní pomocí stlačovacího (*squeeze*) testu, tedy závislosti normálové síly na vzdálenosti senzoru ode dna měřicí nádoby. Nejprve je potřeba určit nulovou polohu senzoru, poté je do nádoby nadávkována kapalina o potřebném objemu, která by měla být přibližně v úrovni rysky nacházející se uvnitř nádoby. Pro kalibrovanou nádobu se ryska nachází ve vzdálenosti 19 500 μm ode dna nádoby, při objemu kapaliny 100 ml se hladina kapaliny nachází zhruba 2 000 μm pod ryskou. Je

výhodnější pro určování rozhraní použít vodu, jelikož při stanovování prochází senzor skrz hladinu a mohlo by tak v některých případech dojít k nevratnému poškození mezifázové vrstvy a tím pádem k větší spotřebě vzorku.

Jako příklad hledání mezifázového rozhraní uvedu příklad s roztokem septonexu o koncentraci $0,0002 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. V tomto případě bylo rozhraní určováno přímo s roztokem septonexu, jelikož povrchově aktivní látky netvoří pevný mezifázový film, který by mohl být poničen. Cílem bylo dosáhnout závislosti uvedené na Obr. 31. Do měřicí nádoby bylo nadávkováno 100 ml tohoto roztoku, senzor byl umístěn do vzdálenosti $21\,000 \mu\text{m}$, aby při pohybu dolů část cesty urazil ve vzduchu a byl patrný přechod senzoru ze vzduchu do roztoku. Test byl nastaven tak, aby senzor klesl do vzdálenosti $14\,500 \mu\text{m}$ od nulové pozice, ve které byl téměř ponořený. Mezifázové rozhraní se nachází ve výšce, které odpovídá $F_N = 0 \text{ N}$.



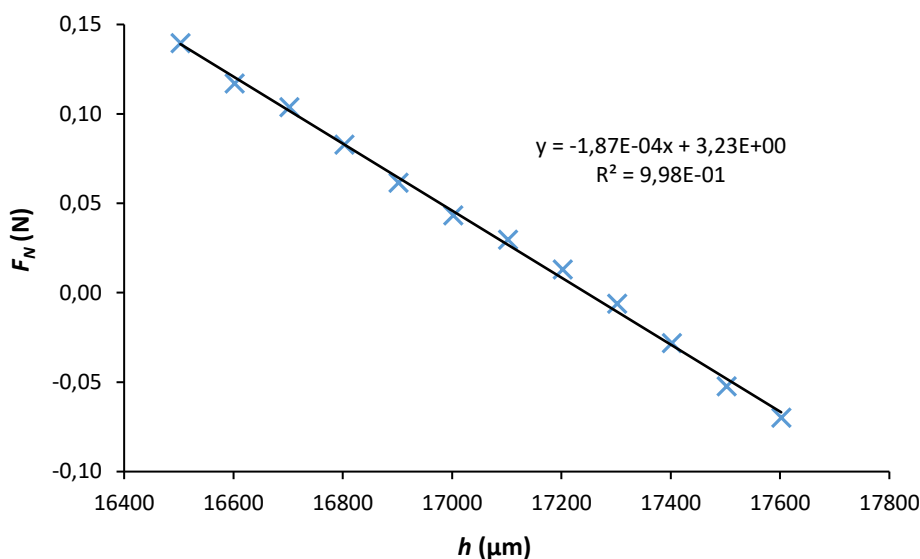
Obr. 31: Závislost normálové síly na vzdálenosti senzoru ode dna měřicí nádoby

Pro výpočet přesné polohy mezifázového rozhraní byla lineární část obsahující nulovou hodnotu normálové síly od bodu $17\,602$ do bodu $16\,503$ proložena spojnicí trendu (Obr. 32) a z rovnice této přímky byla vypočítána přesná hodnota polohy rozhraní následovně:

$$x = \frac{-3,23}{-1,87 \cdot 10^{-4}} = 17245 \mu\text{m}$$

Pro výpočet byly použity přesné hodnoty koeficientů rovnice určené pomocí funkce LINREGRESE programu MS Excel.

Při měření stále stejného objemu vzorku stačí pouze jedno určení polohy rozhraní. Při změně objemu je třeba polohu určit znovu.



Obr. 32: Závislost normálové síly na vzdálenosti senzoru od nulové polohy

Tímto způsobem byla určována mezifázová rozhraní pro všechny experimenty. Hodnoty pro všechna měření vycházely téměř shodně, protože byl používán stále stejný objem vzorku. Mírné odchylky mohly být způsobeny výpočtem, protože hodnota spolehlivosti u regresní přímky nebyla vždy stejná. Při používání stále stejného objemu tedy stačí pouze jedno stanovení polohy mezifázového rozhraní.

5.3 Optimalizace parametrů

5.3.1 Objem kapalin

Jak už bylo zmíněno v kapitole 5.1, objem kapalin je závislý na použité geometrii, jelikož senzory mají různou citlivost. Zatímco při použití kroužku stačí na jedno měření 10 až 20 ml vodné fáze, při použití bikonického senzoru je pro jedno měření potřeba 100 ml vodné fáze, což je dáno ryskou na vnitřní straně měřicí nádoby. Pokud se jedná o rozhraní kapalina-kapalina, minimální objem druhé fáze je opět závislý na typu senzoru, jelikož senzor musí být zcela ponořený. Tloušťka drátku, kterým je tvořen kroužek, je 0,36 mm, takže k jeho ponoření stačí minimální množství druhé fáze. V případě bikonického senzoru je k jeho ponoření potřeba větší množství druhé fáze, na měřicí nádobě je ohraničeno i doporučené množství pro druhou fázi pro přesné měření.

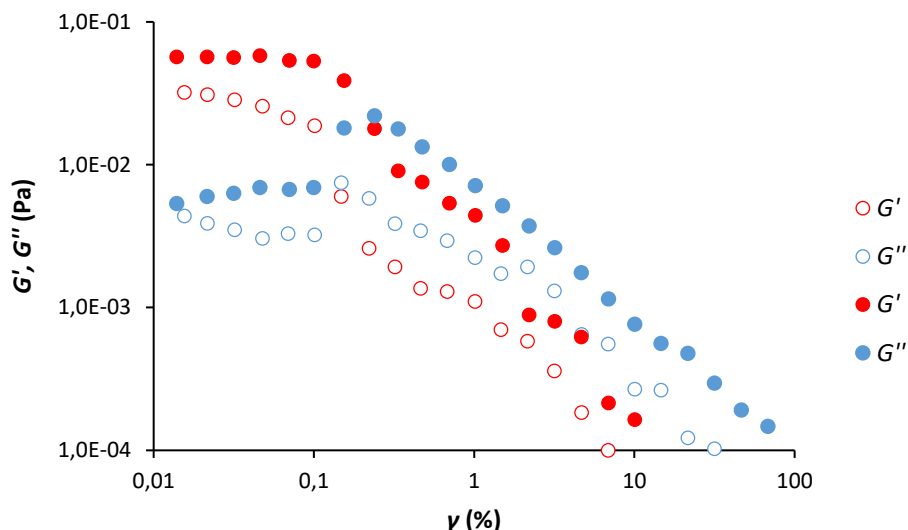
Objem druhé fáze záleží i na cíli konkrétního měření. Pokud je difúze přes mezifázové rozhraní do druhé fáze žádaný jev, je výhodné použít fáze v poměru 1:1. Pokud tento jev není žádaný, je vhodné použít pouze minimální množství nutné k ponoření senzoru.

Při použití obou geometrií je nejpodstatnější používat stále stejné objemy pro všechna měření, která jsou prováděna v rámci jednoho výzkumu. Pokud by nebyly dodrženy stále stejné objemy, nebylo by možné porovnávání mezifázových rozhraní roztoků s různými koncentracemi látek tvořících mezifázový film, protože adsorbované množství látky na mezifázové rozhraní by nebylo závislé pouze na koncentraci.

Na rozhraní kapalina-kapalina platí to stejné i pro čistou fázi. Pokud by čistá fáze bylo v jednom případě více než ve druhém případě, difundovalo by do čisté fáze více molekul a bylo

by ovlivněno chování celé soustavy. Proto je velmi důležité dodržovat stejné podmínky při všech měřeních, která jsou potřeba srovnat.

Na Obr. 33 je vidět rozdíl při použití různého objemu vzorku. Viskoelastické moduly se snižují se snižováním objemu, i místo překřížení modulů je posunuto do nižších amplitud deformace. Výsledky získané z měření vzorků s různými objemy tedy není možné porovnávat.



Obr. 33: Amplitudový test pro rozhraní voda-toluen za použití dvou různých objemů vzorku: 40 ml vody (plné značky); 20 ml vody (prázdné značky)

5.3.2 Dávkování kapalin

Vzhledem k tomu, že mezifázová reologie se využívá především ke studiu filmů tvořených povrchově aktivními látkami, je důležité roztok obsahující povrchově aktivní látku (ať už tenzid, protein nebo kombinaci obou možností) nalévat do měřicí nádoby velmi pomalu a opatrně, aby nedocházelo k tvorbě pěny. V případě, že se pěna vytvoří, musí se počkat, než pěna zmizí, protože by její přítomnost mohla ovlivnit výsledky měření. Až poté se na hladinu umístí senzor.

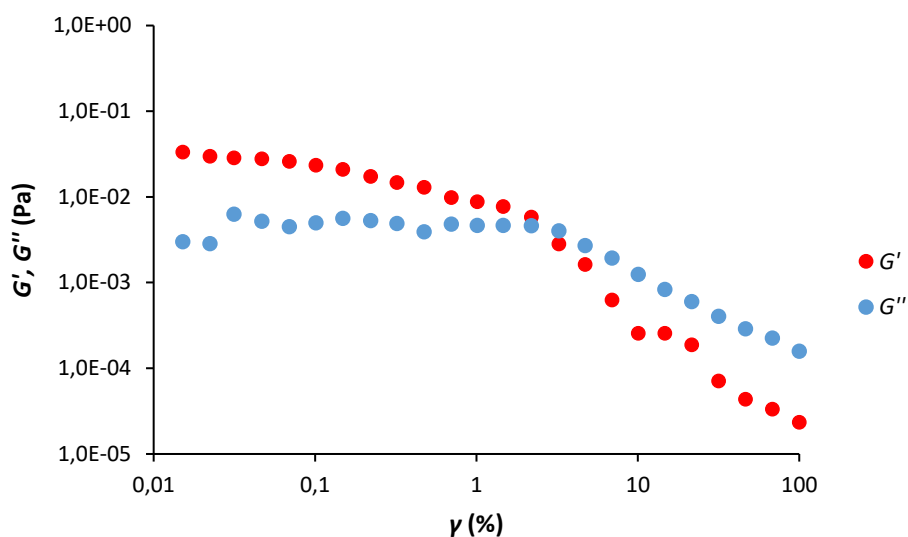
V případě rozhraní kapalina-kapalina se fáze s nižší hustotou (většinou organická) opět musí nalévat velmi pomalu a opatrně, aby nedošlo k porušení mezifázové vrstvy nebo k promíchání fází. Při použití kroužku je možné využít rozprašovač, který poskytne tenkou rovnoměrnou vrstvu a její nanášení je šetrné ke spodní fázi. Pokud je potřeba horní fáze nadávkovat více, než stačí k ponoření kroužku, je dobré kapalinu dávkovat něčím, co tvoří tenký pomalý proud, např. pipeta nebo kapátko.

Pro účely této práce byla fáze s nižší hustotou dávkována opatrně pomocí kapátka na fázi s vyšší hustotou.

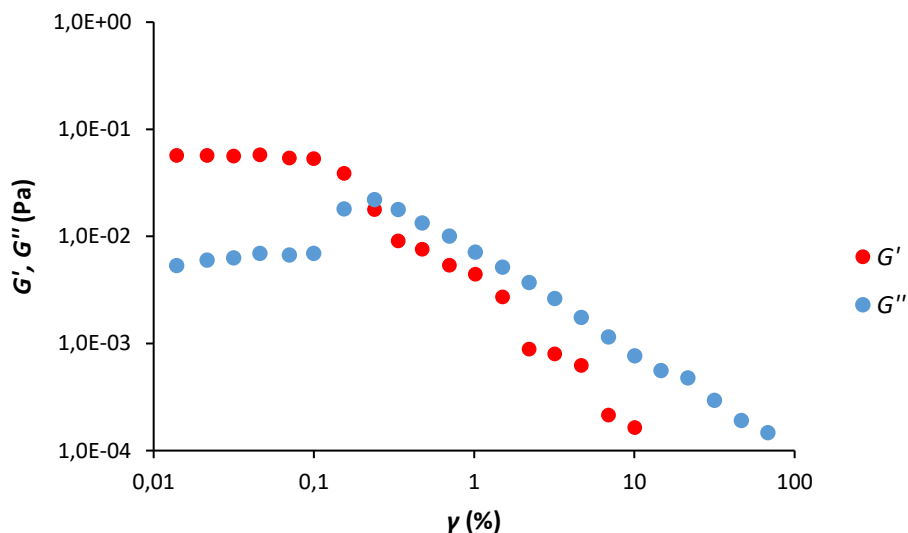
5.3.3 Porovnání rozhraní voda-toluen a chloroform-voda – amplitudové testy

Při porovnání amplitudových testů (Obr. 34 a Obr. 35) jde vidět, že u soustavy chloroform-voda převažuje elastická složka pro větší rozsah amplitudy deformace než u rozhraní voda-toluen. U rozhraní chloroform-voda byla limitní amplituda deformace určena na 0,5 %, kdežto

u rozhraní voda-toluen byla limitní amplituda deformace stanovena na 0,1 %. V amplitudovém testu rozhraní chloroform-voda převažuje elastická složka až do amplitudy deformace 2 %, u rozhraní voda-toluen dochází k překřížení modulů už při amplitudě deformace 0,2 %.



Obr. 34: Amplitudový test pro rozhraní chloroform-voda při $f = 1$ Hz

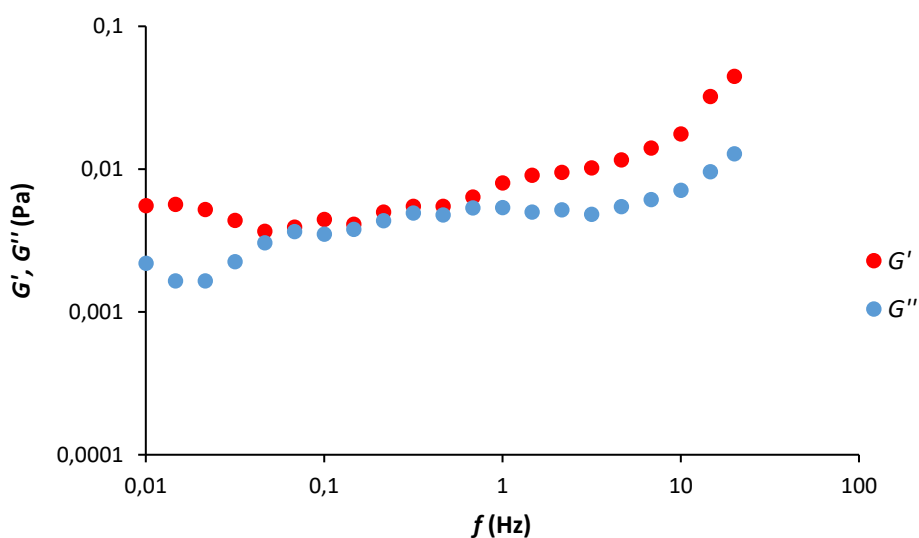


Obr. 35: Amplitudový test pro rozhraní voda-toluen při $f = 1$ Hz

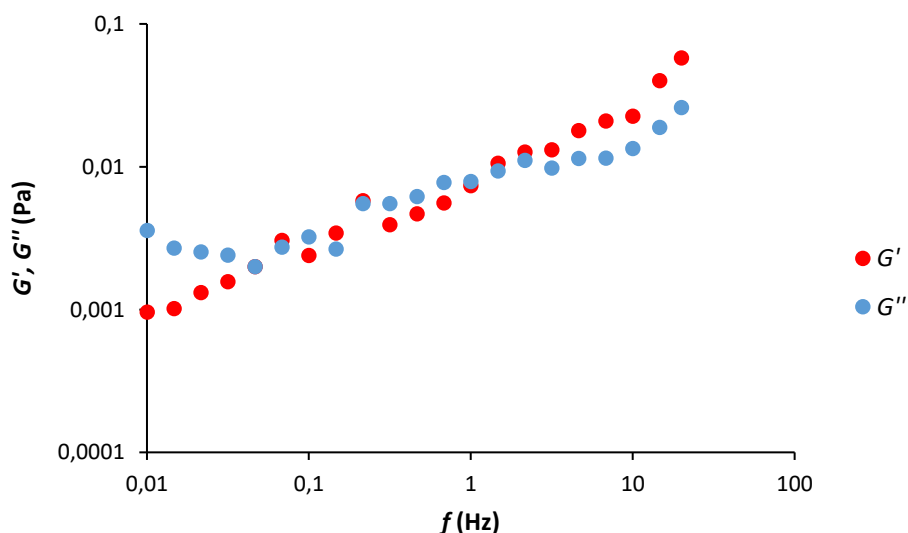
5.3.4 Porovnání rozhraní voda-toluen a chloroform-voda – frekvenční testy

Na Obr. 36 a Obr. 37 jsou zobrazeny frekvenční závislosti obou měřených typů rozhraní kapalina-kapalina. Mezifázové rozhraní chloroform-toluen vykazuje převažující elastické chování mezifázového rozhraní, u kterého dochází k deformaci při frekvenci okolo 3 Hz, u rozhraní voda-toluen dochází k deformaci při frekvenci oscilací odpovídající přibližně hodnotě 7 Hz. Rozhraní voda-toluen proto vykazuje vyšší elasticitu, než mezifázové rozhraní chloroform-voda.

Chování mezifázových rozhraní voda-organická látka je závislé na polaritě organické fáze. Čím je organická fáze polárnější, tím více dochází k vazbám mezi molekulami vody a organické fáze. Na rozhraní voda-nepolární organická látka nedochází k téměř žádným interakcím mezi molekulami obou fází a molekuly vody interagují pouze mezi sebou. V tomto případě se jedná o dvě velmi málo polární organické kapaliny, kde chloroform je polárnější než toluen. Na rozhraní chloroform-voda dochází k většímu počtu vazeb mezi molekulami obou fází, než na rozhraní voda-toluen. Protože mezi molekulami vody se na rozhraní uplatňují vodíkové můstky, elektrostatické a van der Waalsovy síly, je rozhraní voda-toluen rigidnější než rozhraní chloroform-voda a tím pádem také snadněji zdeformovatelné.



Obr. 36: Frekvenční test pro rozhraní chloroform-voda při $\gamma = 0,5\%$



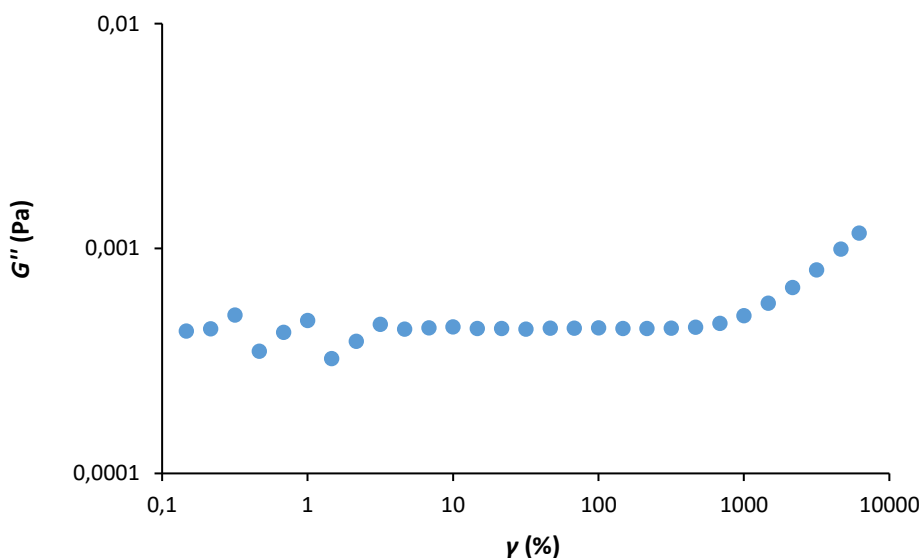
Obr. 37: Frekvenční test pro rozhraní voda-toluen při $\gamma = 0,1\%$

Metoda mezifázové reologie s použitím platinového kroužku je pro studium mezifázových rozhraní vhodná, protože citlivost přístroje je dostatečná na stanovení viskoelastických vlastností mezifázových rozhraní.

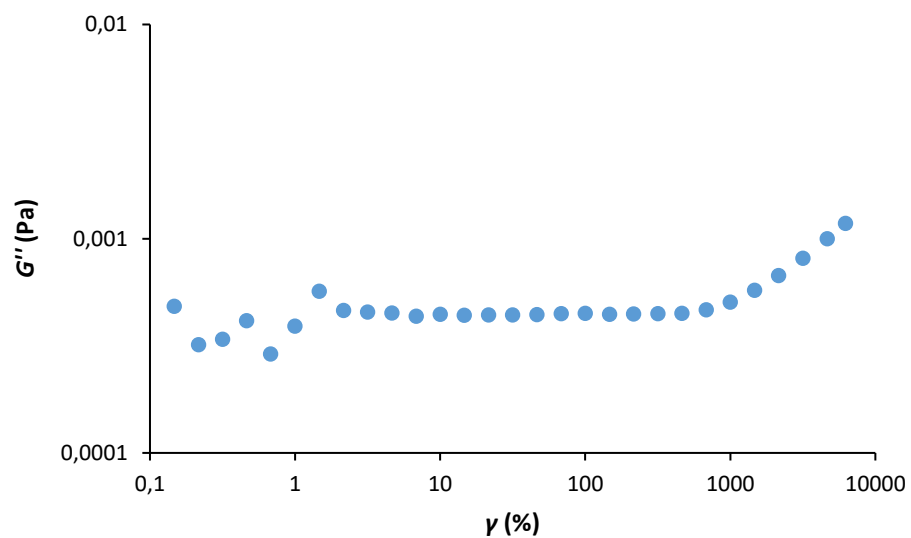
5.4 Povrchově aktivní látky (septonex)

5.4.1 Amplitudové testy

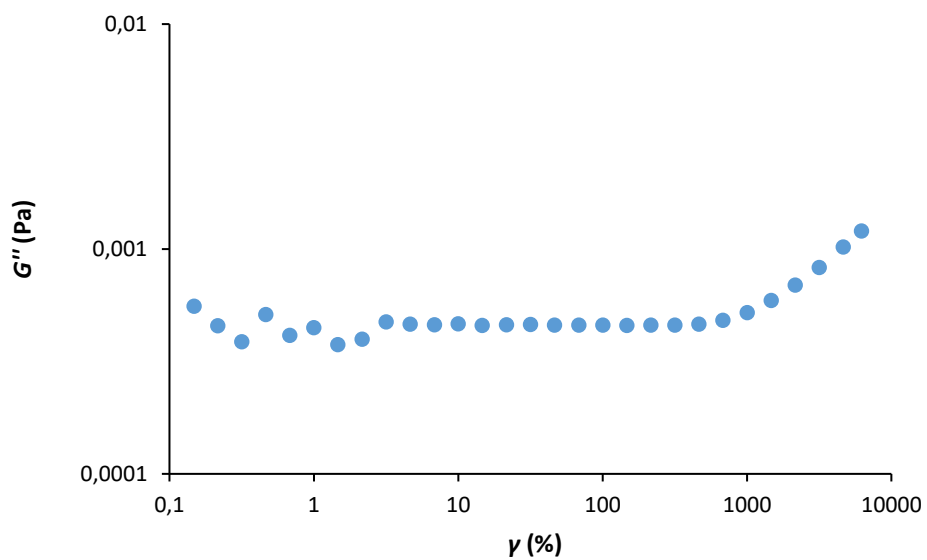
Amplitudové testy byly měřeny pro čtyři koncentrace septonexu, a to $0,0002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,0006 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $0,0008 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (CMC) a $0,0012 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Výsledky měření jsou uvedeny na Obr. 38, Obr. 39, Obr. 40 a Obr. 41. V grafech se objevuje pouze viskózní modul. Je to dáno tím, že molekuly septonexu směřují nepolární kladně nabitou částí směrem z roztoku a polární uhlíkovým řetězcem do roztoku. Stejně nabitě nepolární části tenzidu se vzájemně odpuzují a snižují tak povrchové napětí (v porovnání s povrchovým napětím vody, kde jsou molekuly drženy pohromadě vodíkovými můstky, elektrostatickými interakcemi a van der Waalovými silami), tím pádem má povrchová vrstva viskózní charakter. Jde vidět, že průběh viskózního modulu je při amplitudovém testu u všech čtyř koncentrací stejný. Lineární oblast začíná ve všech případech mezi 2–3 % deformace, v nižších hodnotách se modul nechová lineárně, což bylo nejspíše způsobeno použitím bikonického senzoru, který není příliš vhodný pro měření viskoelastických vlastností mezifázových vrstev s nízkou viskozitou. K deformaci mezifázového rozhraní docházelo ve všech případech při stejné amplitudě deformace, tj. 464 %.



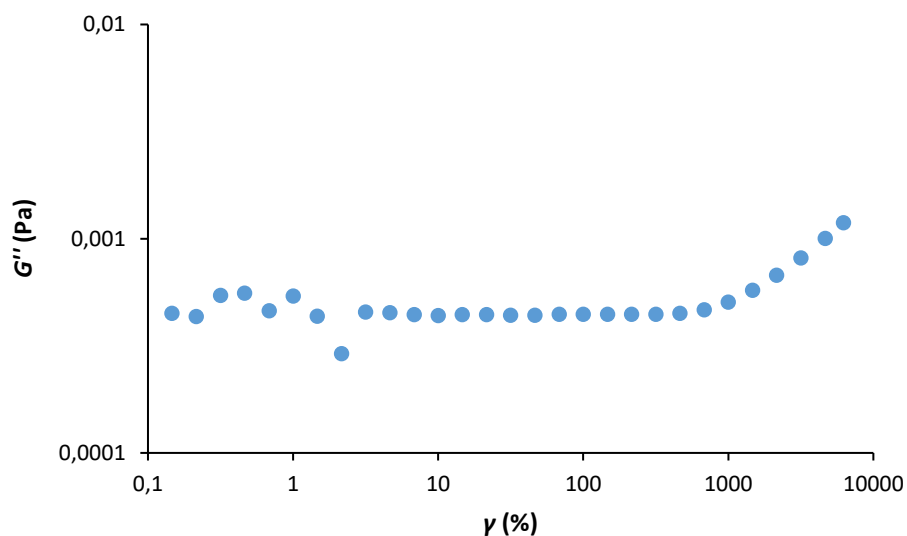
Obr. 38: Závislost viskózního modulu na amplitudě deformace pro koncentraci septonexu $0,0002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 39: Závislost viskózního modulu na amplitudě deformace pro koncentraci septonexu $0,0006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obr. 40: Závislost viskózního modulu na amplitudě deformace pro koncentraci septonexu $0,0008 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (CMC)

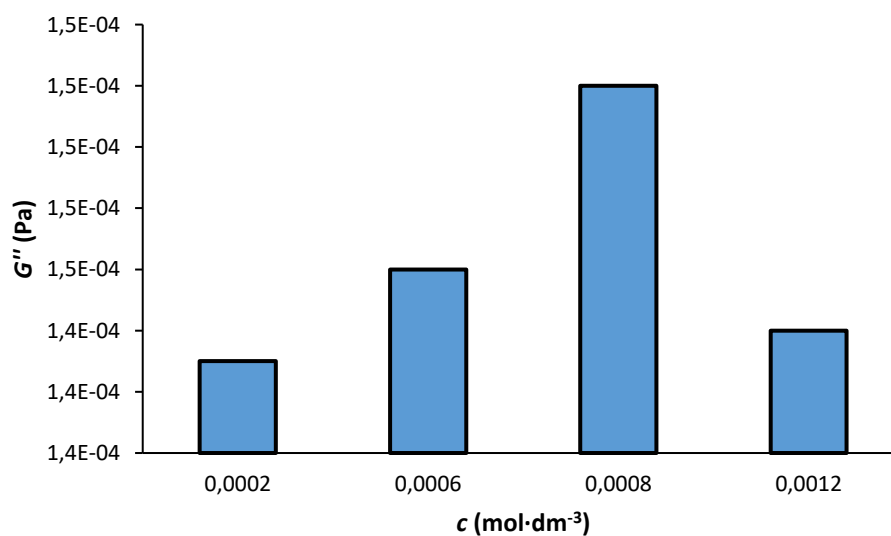


Obr. 41: Závislost viskózního modulu na amplitudě deformace pro koncentraci septonexu $0,0012 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Byly zaznamenány rozdíly v hodnotách viskózního modulu v LVO a v maximální dosažené hodnotě viskózního modulu pro různé koncentrace. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Průměrné hodnoty viskózního modulu dosažené v amplitudovém testu

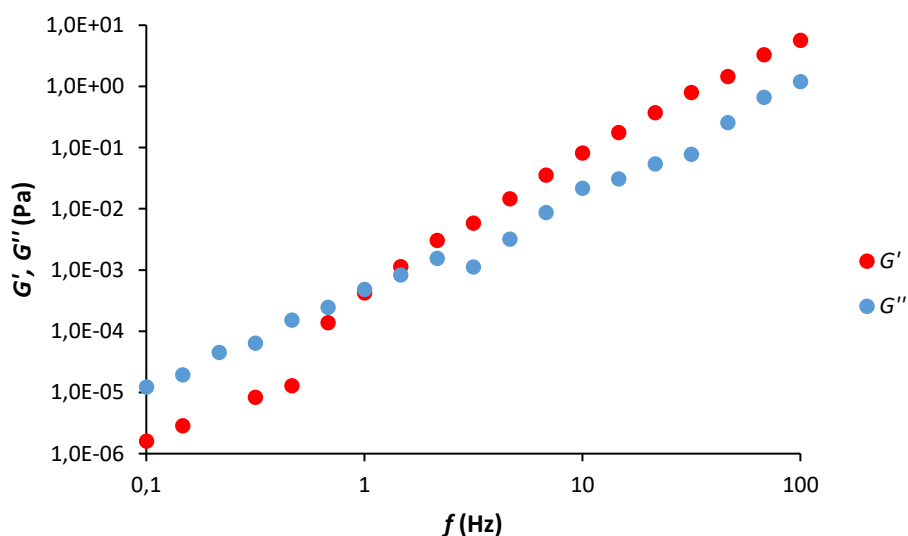
Průměrné hodnoty viskózního modulu v LVO				
$c_{\text{septonex}} \text{ (mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{)}$	$2\cdot 10^{-4}$	$6\cdot 10^{-4}$	$8\cdot 10^{-4}$	$12\cdot 10^{-4}$
$G'' \text{ (Pa)}$	$4,44\cdot 10^{-4}$	$4,46\cdot 10^{-4}$	$4,62\cdot 10^{-4}$	$4,45\cdot 10^{-4}$
Nejvyšší dosažené hodnoty viskózního modulu				
$G'' \text{ (Pa)}$	$1,17\cdot 10^{-3}$	$1,18\cdot 10^{-3}$	$1,20\cdot 10^{-3}$	$1,18\cdot 10^{-3}$



Obr. 42: Závislost hodnot viskózního modulu v LVO na koncentraci septonexu

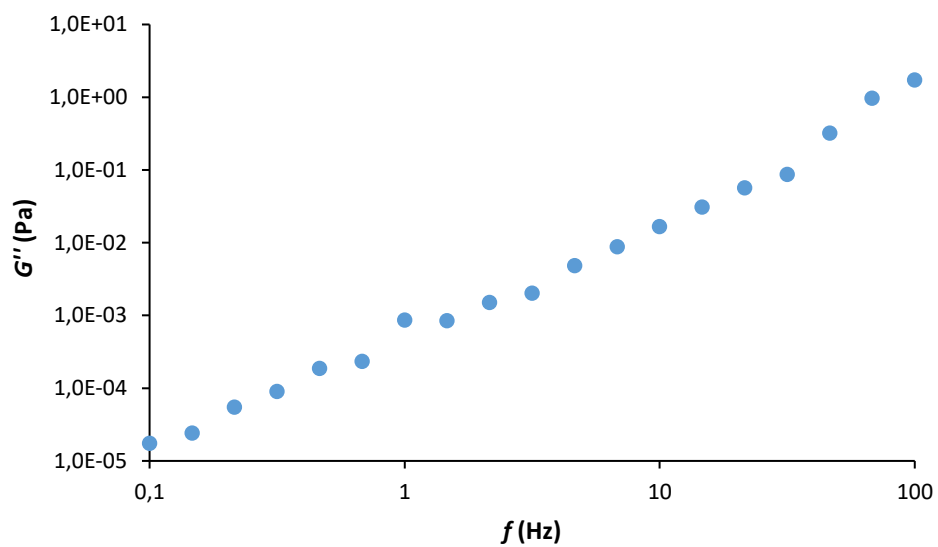
Na Obr. 42 můžeme vidět, že při hodnotě CMC ($0,0008 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) došlo ke změně průběhu závislosti viskózního modulu na koncentraci, přičemž viskózní modul roste do CMC a poté klesá. Rozdíly v hodnotách viskózních modulů jsou ale velmi malé a bylo by potřeba provést měření s více opakováními, abychom zjistili, zda se jedná ze statistického hlediska o signifikantní rozdíly nebo pouze o chybu měření. Tuto změnu průběhu závislosti viskózního modulu na koncentraci způsobuje přítomnost micel v roztoku a náhlé snížení počtu volných molekul tenzidu. Čím vyšší je viskózní modul v LVO, tím rigidnější je mezifázová vrstva, která je v případě tenzidů ovlivňována rozložením a interakcemi molekul tenzidu v celém objemu roztoku. Při nízké koncentraci jsou molekuly tenzidu v roztoku od sebe více vzdáleny než při vyšší koncentraci a interakce mezi sítí tenzidů vytvořenou v roztoku a molekulami tenzidu na rozhraní jsou slabší a rozhraní je méně pevné. S rostoucí koncentrací narůstá počet molekul v roztoku a snižuje se prostor mezi jednotlivými molekulami, interakce jsou tedy silnější a takto vytvořená síť molekul v roztoku dokáže lépe stabilizovat povrchovou vrstvu tenzidů. Při překročení kritické micelární koncentrace se ale v roztoku začnou vytvářet micely a tím se výrazně sníží množství volných molekul tenzidu v roztoku, které od překročení CMC zůstává konstantní (nižší než je hodnota CMC). Vzniklé micely brání molekulám v rovnoměrném rozložení v roztoku a toto uspořádání molekul opět nedokáže vrstvu stabilizovat tak, jak tomu bylo v případě koncentrace těsně před kritickou micelární koncentrací, i když koncentrace molekul tenzidu v roztoku a na rozhraní se od dosažení CMC nemění.

5.4.2 Frekvenční testy

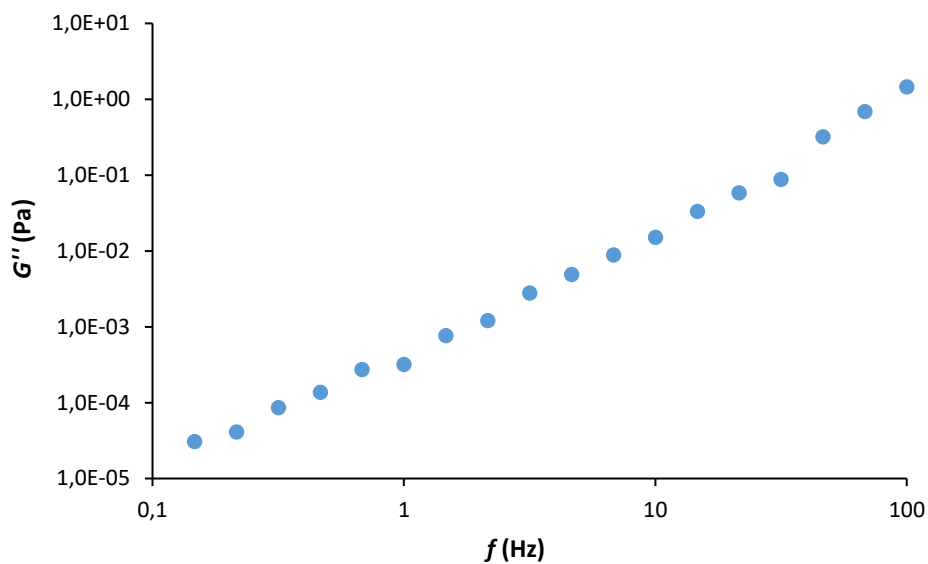


Obr. 43: Závislost viskózního modulu na frekvenci pro koncentraci septonexu $0,0002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

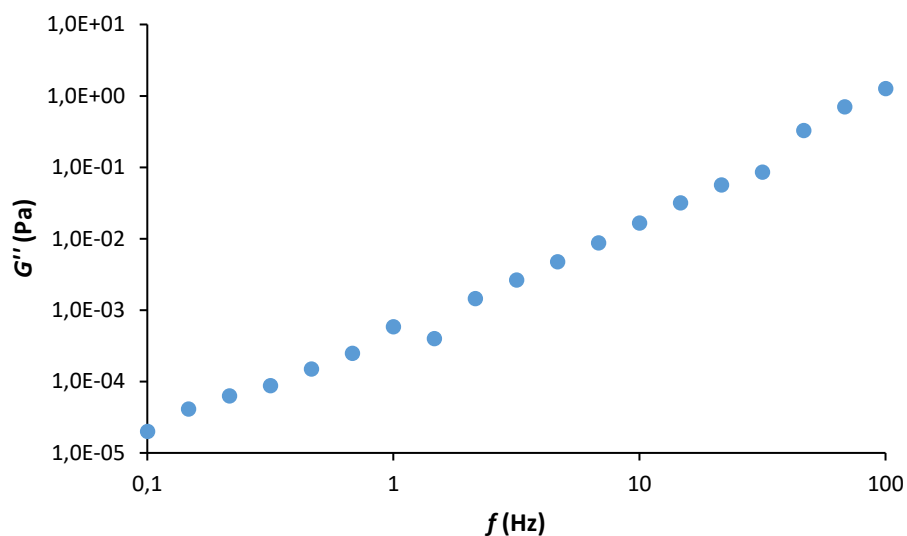
Na Obr. 43 je výsledek frekvenčního testu pro roztok septonexu o koncentraci $0,0002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. V nízkých hodnotách frekvencí oscilací převažoval viskózní modul až do hodnoty frekvence 1 Hz, poté došlo k překřížení modulů. Z grafu je patrné, že oba moduly (elastický a viskózní) vykazují lineární závislost, s rostoucí frekvencí oscilací dochází k nárůstu viskoelastických modulů.



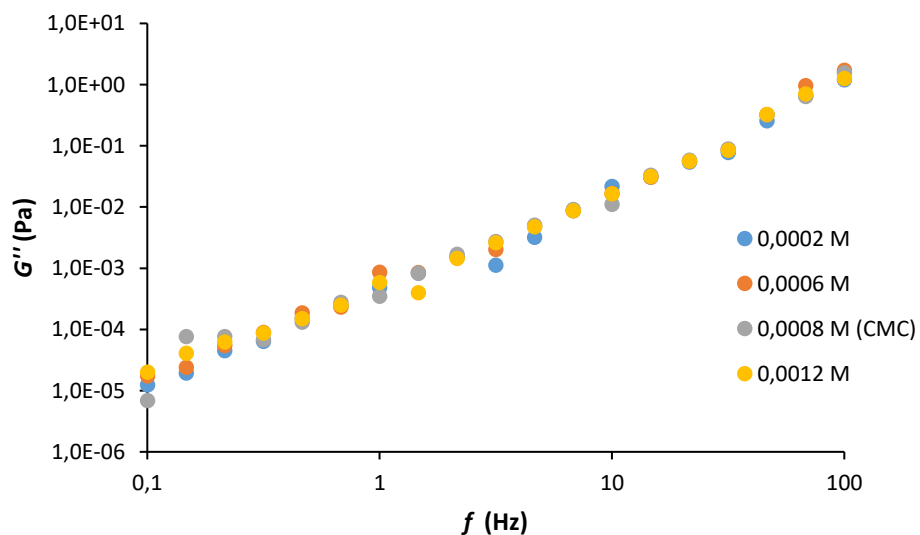
Obr. 44: Závislost viskózného modulu na frekvenci pro koncentraci septonexu $0,0006 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$



Obr. 45: Závislost viskózného modulu na frekvenci pro koncentraci septonexu $0,0008 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (CMC)



Obr. 46: Závislost viskózního modulu na frekvenci pro koncentraci septonexu $0,0012 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

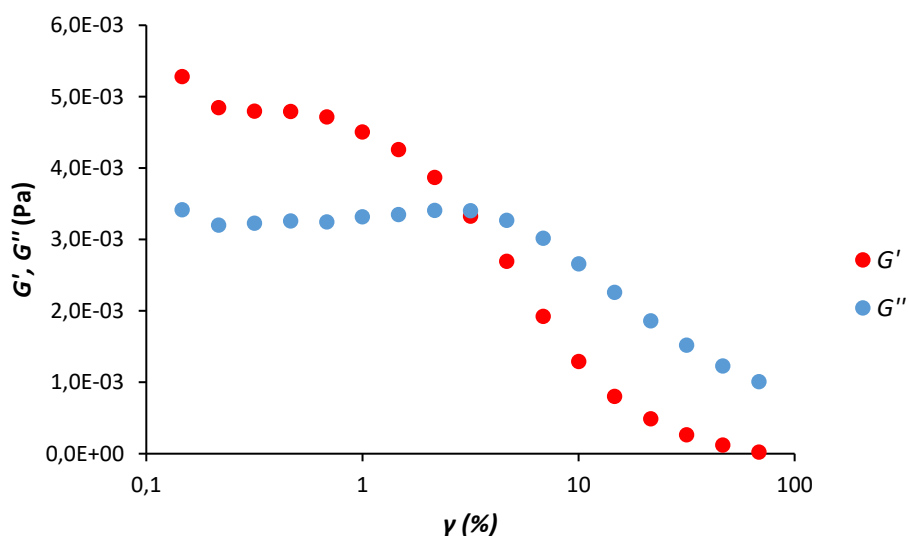


Obr. 47: Závislost viskózního modulu na frekvenci oscilací pro všechny koncentrace septonexu

Pro přehlednost byly do grafu vloženy pouze viskózní moduly z výsledků frekvenčních testů. Výsledky měření jsou stejné pro všechny koncentrace septonexu. Závislost viskózního modulu na frekvenci oscilací vykazuje lineární závislost G'' na frekvenci oscilací bez zřejmé deformace mezifázového rozhraní.

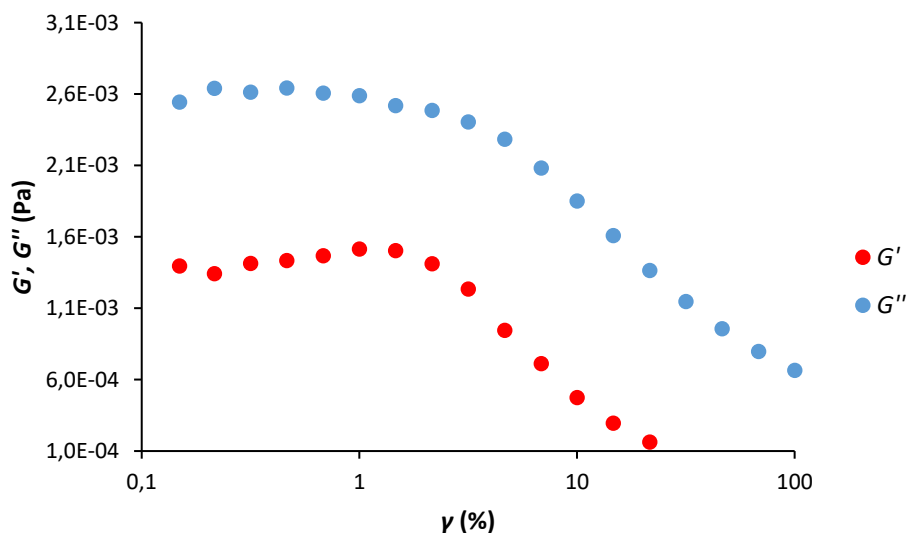
5.5 Hovězí sérový albumin

5.5.1 Amplitudové testy



Obr. 48: Amplitudový test pro roztok BSA o koncentraci $0,00015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Výsledek amplitudového testu je uveden na Obr. 48. V lineární viskoelastické oblasti převyšuje elastický modul viskózní modul, poté dochází ke klesání obou modulů a k jejich překřížení, což je typické pro mezifázové vrstvy, které tvoří chemickou nebo fyzikální síť. K překřížení modulů dochází při amplitudě deformace 3,16 %. Optimální amplituda deformace byla určena na 0,46 %, při které byl proveden frekvenční test.

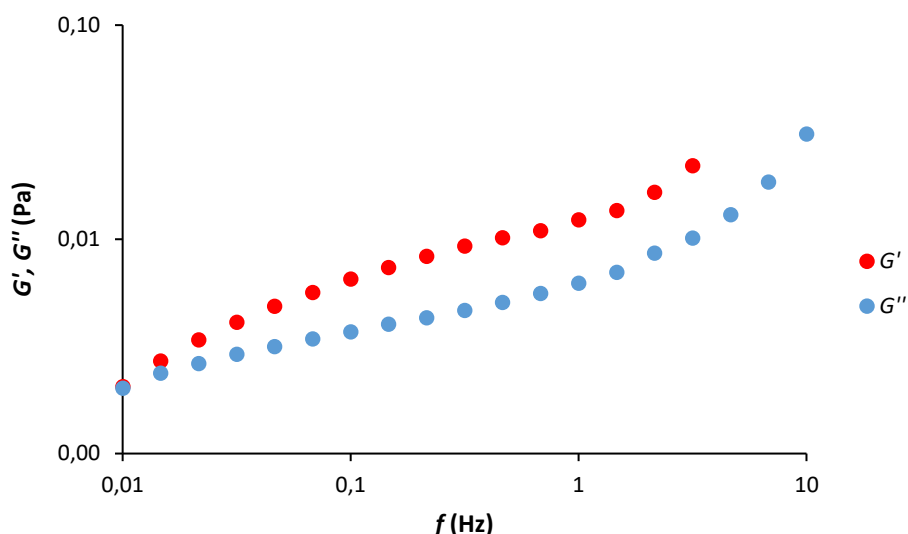


Obr. 49: Amplitudový test pro roztok BSA o koncentraci $0,00015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bez výměny vzorku

Na Obr. 49 je výsledek amplitudového testu, před kterým nedošlo k výměně vzorku. V tomto případě je viskózní modul vyšší než elastický modul. To je způsobeno tím, že struktura gelovité vrstvy BSA byla nevratně porušena, došlo k neelastické deformaci během předchozího

amplitudového testu a na mezifázovém rozhraní byly pouze vzájemně nepropojené denaturované peptidové řetězce.

5.5.2 Frekvenční testy



Obr. 50: Frekvenční test pro roztok BSA o koncentraci $0,00015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Frekvenční test byl proveden při amplitudě deformace 0,46 %, která byla určena z amplitudového testu na Obr. 48. Z výsledku frekvenčního testu na Obr. 50 můžeme vidět, že elastický modul je po celou dobu vyšší než viskózní modul, tudíž u mezifázového filmu tvořeného hovězím sérovým albuminem převažuje elastická složka. Deformace mezifázové vrstvy nastává při zvyšování viskoelastických modulů, které začíná mezi frekvencemi 0,68 a 1 Hz.

Chování mezifázového rozhraní tvořeného proteiny závisí na primární struktuře proteinů. Rozhraní, které je tvořeno proteinem obsahující celé spektrum aminokyselin, včetně hydrofobních aminokyselin (Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp), vytvoří gelovitý mezifázový film, protože proteiny na rozhraní směřují hydrofobními zbytky ven z vodné fáze a hydrofilními zbytky do vodné fáze, tím je porušena jejich prostorová struktura a proteiny denaturují. Denaturovaný protein ztrácí schopnost rozpustit se ve vodě a vytvoří na rozhraní síťovitou strukturu.

6 ZÁVĚR

Hlavním úkolem této práce byla optimalizace metody mezifázové reologie. Optimalizace metody proběhla na dvou typech rozhraní (kapalina-kapalina a kapalina-vzduch), na kterých byly vybírány nejvhodnější podmínky a parametry měření jako je vhodný objem fází a jejich dávkování.

Při měření byly používány dva různé senzory (platinový kroužek-*Du Nouy Ring* a bikonický senzor). Každý z uvedených senzorů má své výhody i nevýhody a každý je vhodný pro různé typy vzorků. Platinový kroužek je vhodný pro měření viskoelastických vlastností viskózních rozhraní nebo naopak rozhraní mající skelný charakter, jelikož robustní bikonický senzor by je ihned nevratně porušil. Je tedy potřeba volit senzor podle toho, jaké jsou očekávány vlastnosti mezifázového rozhraní a jaké množství vzorku je k dispozici. Každý ze senzorů vyžaduje rozdílný přístup jak v péči, tak v postupu měření, zejména při hledání polohy mezifázového rozhraní.

Nejprve byly měřeny viskoelastické vlastnosti rozhraní voda-organická fáze. Chování těchto mezifázových rozhraní je ovlivněno především polaritou organické fáze, jejichž rigidita se snižuje spolu se zvyšující se polaritou. Pomocí mezifázové reologie by tedy bylo možné ověřovat polaritu organických rozpouštědel, protože se zvyšující se polaritou na rozhraní narůstá množství interakcí mezi molekulami vody a organické fáze, které jsou slabší, než interakce mezi samotnými molekulami vody.

Dalším testovaným systémem bylo rozhraní kapalina-vzduch za použití vodného roztoku septonexu o čtyřech různých koncentracích. Amplitudové testy vykazovaly mírné rozdíly v hodnotách viskózních modulů, přičemž ke změně průběhu závislosti viskózního modulu na koncentraci došlo právě při kritické micelární koncentraci. Rozdíly v hodnotách viskózních modulů byly ale tak malé, že je možné, že se jednalo o chybu měření. Pokud by se ale tento trend statisticky potvrdil, mohla by mezifázová reologie sloužit jako další metoda stanovování kritické micelární koncentrace (vedle tenziometrie, voltametrie aj.). Pro mezifázová rozhraní tvořené tenzidy je metoda mezifázové reologie nevhodná, jelikož molekuly tenzidů na rozhraní nejsou vzájemně propojené a zesíťované a ihned po ukončení deformace se vrátí opět do původního stavu nezávisle na aplikované amplitudě deformace, tudíž není možné mezifázovou vrstvu deformovat neelastickou deformací.

Posledním testovaným rozhraním bylo rozhraní vodný roztok hovězího sérového albuminu-vzduch. Toto rozhraní vykazovalo převážně elastické vlastnosti. Pro stanovování viskoelastických vlastností mezifázových rozhraní tvořených proteiny je mezifázová reologie vhodnou metodou. Pomocí mezifázové reologie je možné stanovovat mechanickou, tepelnou i časovou stabilitu mezifázových rozhraní tvořených proteiny, hydrofobně modifikovanými sacharidy nebo jinými polyelektrolyty vhodnými pro využití v medicíně, farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu jako emulgátory nebo nosiče léčiv.

Metoda se ale svým využitím neomezuje pouze na rozhraní tvořená jednotlivými molekulami, ale je vhodná i pro studium celých biologických systémů, především bakterií, u kterých umožňuje stanovovat jejich hydrofobicitu, jelikož množství bakterií adsorbovaných na mezifázové rozhraní je přímo úměrné jejich hydrofobicitě a rigidita rozhraní se zvyšuje s počtem adsorbovaných bakterií. Dále je možné sledovat tvorbu biofilmu, přičemž rigidita

rozhraní během tvorby biofilmu roste. Studium bakteriálního biofilmu je důležité zejména pro potravinářský průmysl a medicínu. Metodou mezifázové reologie je možné pozorovat tvorbu biofilmu u bakterií nebezpečných pro člověka v čase, v rozdílných teplotních podmínkách a na různých typech rozhraní.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. Brno: Fakulta chemická VUT, 1996. ISBN: 9788023809282.
- [2] BARNES, H.A. *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier, 1998. ISBN: 0444874690.
- [3] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 2014. ISBN: 978-80-244-4178-8.
- [4] 3. Kapitola: Reologie. *ÚSTAV FYZIKY A MATERIÁLOVÉHO INŽENÝRSTVÍ: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně*. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf
- [5] MEZGER, Thomas. *The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers*. Hannover: Curt R. Vincentz Verlag. 2002. ISBN: 3878707452.
- [6] WEITZ, David, Hans WYSS a Ryan LARSEN. Oscillatory Rheology: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. *G.I.T Laboratory Journal*. 2007, **3**(4), 68-70.
- [7] MILLER, Reinhard, James FERRI, Aliyar JAVADI, Jürgen KRÄGEL, Nenad MUCIC a Rainer WÜSTNECK. Rheology of interfacial layers. *Colloid and Polymer Science*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, **288**(9), 937-950. DOI: 10.1007/s00396-010-2227-5.
- [8] WICHTERLE, Kamil. *Povrchové/mezifázové napětí v hydrostatice a hydrodynamice*. Praha: Procesní inženýrství. 1997. MAPRINT. ISBN: 8086059243.
- [9] WARBURTON, Brian. Interfacial rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. Elsevier Ltd, 1996, **1**(4), 481-486. DOI: 10.1016/S1359-0294(96)80116-6.
- [10] DERKACH, S., J. KRÄGEL a R. MILLER. Methods of measuring rheological properties of interfacial layers (Experimental methods of 2D rheology). *Colloid Journal*. Dordrecht: SP MAIK Nauka/Interperiodica, 2009, **71**(1), 1-17. DOI: 10.1134/S1061933X09010013.
- [11] *Rheology: v.1*. Oxford: EOLSS Publishers Co Ltd. 2010. ISBN: 9781848267695.
- [12] EDWARDS, David, Howard. BRENNER a D. WASAN. *Interfacial transport processes and rheology*. Boston: Butterworth-Heinemann. 1991. ISBN 0750691859.
- [13] FRANCK, A. The AR-G2 with Du Noüy Ring for Interfacial Rheometry. *TA Instruments*. Dostupné z: http://www.tainstruments.com/pdf/literature/APN012_V1%20AR-G2%20and%20Du%20Nouy%20ring.pdf
- [14] Interfacial Rheology: Accessories. *TA Instruments*. Dostupné z: <http://docs.tainstruments.com/STOREDPDF/DHR/Interfacial%20Rheology.pdf>

- [15] SHAW, Duncan. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. New York: Butterworth Heinemann. 1992. ISBN: 0750611820.
- [16] KOPECKÝ, F., M. VOJTEKOVÁ, J. OREMUSOVÁ a O. GRESÁKOVÁ. Micellization of [1-(Ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium Bromide Studied by Conductometry and Potentiometry. *Chemical Papers*. 1993, **47**(1), 55-59.
- [17] Carbaethopendecine bromide. *PubChem: Open Chemistry Database*. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160944#section=Top>
- [18] Mediatly: Kompletní databáze léčivých přípravků dostupných v České republice. Dostupné také z: <https://mediately.co/cz/drugs>
- [19] PATRA, Satyajit, Kotni SANTHOSH, Ashok PABBATHI a Anunay SAMANTA. Diffusion of organic dyes in bovine serum albumin solution studied by fluorescence correlation spectroscopy. *RSC Advances*. 2012, **2**(14), 6079-6086. DOI: 10.1039/c2ra20633a.
- [20] A. BOS, Martin a Ton VAN VLIET. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V, 2001, **91**(3), 437-471. DOI: 10.1016/S0001-8686(00)00077-4.
- [21] ROY, Audrey, Lazhar BENYAHIA, Michel GRISEL a Frederic RENOU. Shear interfacial viscoelasticity of native and hydrophobically modified xanthan at oil/water interface. *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 2016, **61**, 887-894. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.07.016.
- [22] JUNG, Jin-Mi, Deniz GUNES a Raffaele MEZZENGA. Interfacial activity and interfacial shear rheology of native β -lactoglobulin monomers and their heat-induced fibers. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2010, **26**(19), 15366. DOI: 10.1021/la102721m.
- [23] ROTH, S, B MURRAY a E DICKINSON. Interfacial shear rheology of aged and heat-treated beta-lactoglobulin films: displacement by nonionic surfactant. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, **48**(5), 1491. DOI: 10.1021/jf990976z.
- [24] ERNI, Philipp, Erich WINDHAB, Rok GUNDE, Muriel GRABER, Bruno PFISTER, Alan PARKER a Peter FISCHER. Interfacial rheology of surface-active biopolymers: Acacia senegal gum versus hydrophobically modified starch. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(11), 3458. DOI: 10.1021/bm700578z.
- [25] LUCERO CARO, Ana, M^a. RODRÍGUEZ NIÑO a Juan RODRÍGUEZ PATINO. The effect of pH on surface dilatational and shear properties of phospholipid monolayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V, 2008, **327**(1), 79-89. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.06.007.
- [26] BALDURSDOTTIR, Stefania, Maria FULLERTON, Signe NIELSEN a Lene JORGENSEN. Adsorption of proteins at the oil/water interface—Observation of protein

- adsorption by interfacial shear stress measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V, 2010, **79**(1), 41-46. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.020.
- [27] WANG, Lijun, Hongen XIE, Xiuying QIAO, An GOFFIN, Tom HODGKINSON, Xuefeng YUAN, Kang SUN a Gerald FULLER. Interfacial rheology of natural silk fibroin at air/water and oil/water interfaces. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2012, **28**(1), 459. DOI: 10.1021/la2041373.
- [28] ESPINOSA, Gabriel a Dominique LANGEVIN. Interfacial shear rheology of mixed polyelectrolyte-surfactant layers. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2009, **25**(20), 12201. DOI: 10.1021/la901730f.
- [29] MAAS, Michael, Heinz REHAGE, Holger NEBEL a Matthias EPPL. A detailed study of closed calcium carbonate films at the liquid-liquid interface. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* [online]. 2009, **25**(4), 2258. DOI: 10.1021/la803446q.
- [30] REIS, Pedro, Krister HOLMBERG, Reinhard MILLER, Jorgen KRÄGEL, Dmitri GRIGORIEV, Martin LESER a Heribert WATZKE. Competition between lipases and monoglycerides at interfaces. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2008, **24**(14), 7400. DOI: 10.1021/la800531y.
- [31] RÜHS, P.A., L. BÖCKER, R.F. INGLIS a P. FISCHER. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid-liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V, 2014, **117**, 174-184. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023.
- [32] LEOPÉRCIO, Bruna, Paulo DE SOUZA MENDES a Gerald FULLER. Growth Kinetics and Mechanics of Hydrate Films by Interfacial Rheology. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2016, **32**(17), 4203. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00703.